

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Allan Tobi

**CendR-peptiidiga suunatud terapeutiliste hõbeda nanoosakeste
mõju eesnäärmekartsinoomi rakkudele**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad:

Anne-Mari A. Willmore, MSc

Prof Tambet Teesalu, PhD

Prof Margus Pooga, PhD

TARTU 2016

SISUKORD

SISUKORD	2
INFOLEHT.....	4
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Kasvajad.....	7
1.2 <i>In vitro</i> kasvajamudelid	9
1.3 Kasvajate biomarkerid	11
1.3.1 Neuropiliin-1	12
1.4 Suunatud kasvajaravi	13
1.4.1 Kasvajakude penetreerivad peptiidid.....	14
1.4.2 Monometüülauristatiin E	15
EKSPERIMENTAALOSA	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Materjalid ja metoodika	17
2.2.1 Hõbeda nanoosakeste süntees ja funktsionaliseerimine	17
2.2.2 Hõbeda nanoosakeste iseloomustus.....	18
2.2.3 Rakukultuur	19
2.2.4 Konfokaalmikroskoopia	19
2.2.5 Läbivoolutsütomeetria	20
2.2.6 AgNP-MMAE-RPAR-i seondumine NRP-1 b1b2 domeenile	21
2.2.7 Märgisevaba rakkude eluvõimelisuse analüüs	21
2.3 Tulemused ja arutelu.....	22

2.3.1	Ag-nanoosakeste iseloomustus.....	22
2.3.2	AgNP-MMAE-RPAR-i NRP-1-vahendatud seondumine PPC-1 rakkudele.....	24
2.3.3	AgNP-MMAE-RPAR-i NRP-1-vahendatud sisenemine PPC-1 rakkudesse	26
2.3.4	AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioonist sõltuv mõju PPC-1 ja M21 rakkudele	27
2.3.5	AgNP-MMAE-RPAR-i tsütotoksiline mõju PPC-1 rakkudele	30
2.3.6	AgNP-MMAE-RPAR-i mõju PPC-1 ja M21 segakultuurile	33
KOKKUVÕTE		35
SUMMARY		36
KIRJANDUSE LOETELU.....		37
KASUTATUD VEEBIAADRESSID		43
LISAD		44
LISA 1. Tsütotoksilisuse pilootkatse.		44
LIHTLITSENTS.....		45

INFOLEHT

CendR-peptiidiga suunatud terapeutiliste hõbeda nanoosakeste mõju eesnäärmekartsinoomi rakkudele

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli uurida vähiravimi monometüülauristatiin E (MMAE) ja CendR-peptiidiga RPARPAR (RPAR) funktsionaliseeritud hõbeda nanoosakeste (AgNP) mõju NRP-1 üleekspresseerivale PPC-1 eesnäärmekartsinoomi rakuliinile *in vitro*. Uurimistöös näidati, et AgNP-MMAE-RPAR seondub spetsiifiliselt NRP-1 retseptorile ja et MMAE lisamine AgNP-RPAR osakestele ei mõjutanud nende seondumisvõimekust. Ag-MMAE-RPAR omas tugevat tsütotoksilist mõju NRP-1 ekspresseerivatele rakkudele. AgNP-MMAE-RPAR-i lisamisel PPC-1 ja M21 rakkude segakultuurile suri 96% sihtmärkrakkudest. Käesolevas uurimistöös väljaarendatud transportsüsteem on mudeliks järgnevatele projektidele.

Märksõnad: suunatud kasvaja ravi, eesnäärmekartsinoom, hõbeda nanoosakesed, CendR-peptiid, monometüülauristatiin E. CERCS kood: B726 kliiniline bioloogia.

Effect of CendR-peptide Targeted Therapeutic Silver Nanoparticles on Prostate Cancer Cells

The aim of the study was to evaluate silver nanoparticles (AgNP) as carriers of cytotoxic compounds to cancer cells. AgNPs were coupled with antineoplastic monomethyl auristatin E (MMAE) and functionalized with CendR peptide RPARPAR (RPAR) that binds to neuropilin-1 (NRP-1) overexpressed in tumors. In a mixed culture of PPC-1 and NRP-1 negative M21 cells, treatment with AgNP-MMAE-RPAR selectively killed 96% of the PPC-1 cells whereas the M21 cells were not affected. AgNP-RPAR particles without MMAE payload had a mild negative effect on cell viability, suggesting that AgNP-RPAR might additionally act as a NRP-1 antagonist. The study demonstrates that peptide-targeted AgNPs can be used as carriers for specific delivery of coupled cytotoxic compounds to the cultured cells. In follow-up studies the efficacy of the AgNP platform for *in vivo* targeted anticancer drug delivery will be evaluated.

Keywords: targeted cancer therapy, silver nanoparticles, C-end Rule peptides, monomethyl auristatin E. CERCS classification: B726 clinical biology.

KASUTATUD LÜHENDID

CendR – C-terminaalse elemendi reegel (ingl. *C-end Rule*)

DMSO – Dimetüülsulfoksiid

EGF – Epidermaalne kasvufaktor

EPR efekt – Kasvaja suurenenud läbilaskvus ja makromolekulide kinnipidamisvõime (ingl. *enhanced permeability and retention effect*)

FAM – 6-[fluorestseiin-5(6)-karboksamido]-heksanoehape-NHS

FDA – USA toidu- ja raviamet

FGF – Fibroblastide kasvufaktor

IC₅₀ – Maksimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni poolväärtus

M21 – Inimese melanoomi rakuliin

mAb – Monoklonaalne antikeha

MMAE – glutamiin-valiin-tsitrulliin-p-aminobensoüülloksükarbonüül-monometüülauristatiin E

NHS – *N*-hüdrosüsuksüinimiid

NRP-1 – Neuropiliin-1

PEG – Polüetüleenglükool

PPC-1 – Inimese eesnäärmekartsinoomi rakuliin

RPAR – N-terminaalse biotiini ja aminoheksaanhappega RPARPAR peptiid

TEM – Transmissioonelektronmikroskoop

VEGF – Vaskulaarne endoteeli kasvufaktor

SISSEJUHATUS

Kasvajad on 8,2 miljoni surmajuhtumiga aastas (2012. aasta seisuga) üks peamisi surmapõhjuseid maailmas. Üha enam tähelepanu leiab suunatud kasvajaravi, mis põhineb kasvajaspetsiifilistel ravimeetoditel. Kasvajaspetsiifilistel ravimsüsteemidel on madalam süsteemne toksilisus ja vähem raskeid kõrvalmõjusid kui tavapärasel keemiaravis kasutatavatel ravimitel. Mõningad kasvajaspetsiifilised ravimid on jõudnud juba kliinilisse kasutusse ja näidanud positiivseid tulemusi. Uue kasvajaravi suunana kasutatakse kasvajate raviks bioühilduvaid tsütotoksiliste ühenditega laaditud nanoosakesi. Nanoosakeste suunamiseks ja nende selektiivsuse tõstmiseks kasutatakse kasvajate biomarkeritele suunatud afiinsusligande (nt peptiidid, antikehad).

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli uurida vähiravimi monometüülauristatiin E ja CendR-peptiidiga RPARPAR funktsionaliseeritud hõbeda nanoosakeste mõju PPC-1 eesnäärmevähirakuliinile. Lisaks uuriti nimetatud nanoosakeste omadusi ning võimet neuropiliin-1 retseptori vahendusel seonduda PPC-1 rakkudele ja neisse siseneda. Väljaarendatud transportsüsteem on mudeliks järgnevatele projektidele. Uurimistöö tehti Tartu Ülikooli Bio- ja Siirdemeditsiini instituudi vähibioloogia uurimisrühmas.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

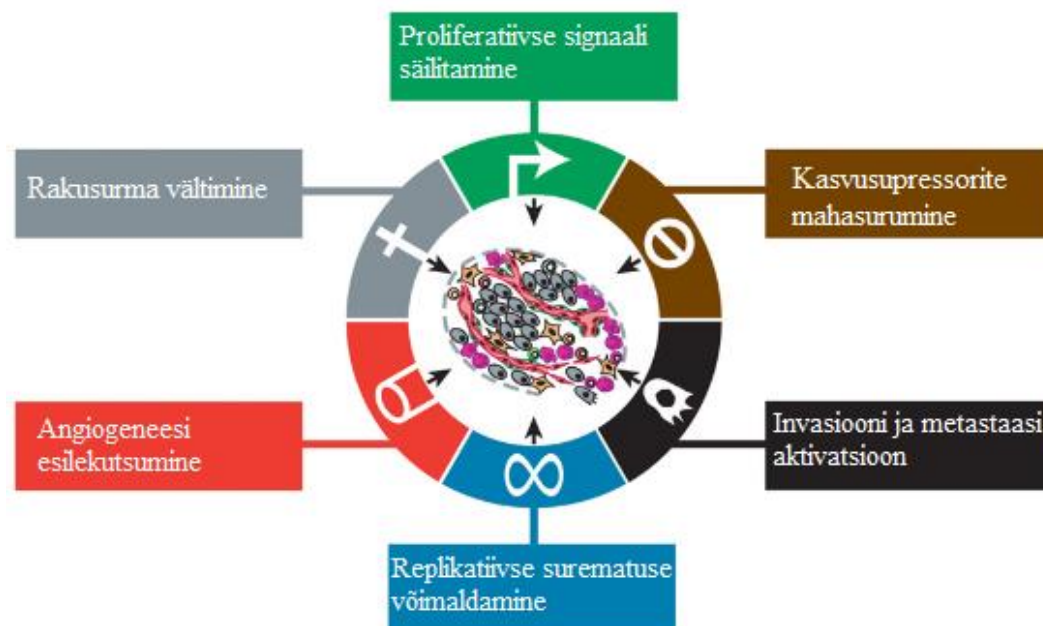
1.1 Kasvajad

Kasvajad saavad alguse rakkudest, mis on kaotanud kontrolli jagunemise ja kasvu üle (Weinberg, 2013). Geneetiliselt on kasvajate tekke peamiseks põhjuseks somaatiliste mutatsioonide kogunemine, mis põhjustavad pöördumatu ülemineku kasvajarakkudeks. Kasvajarakkudele omaseid mutatsioone põhjustavaid mõjureid kutsutakse kantserogeenideks: nende hulka kuuluvad näiteks teatud kiirgused, kemikaalid ja viirused (Heinaru, 2012).

Healoomulised kasvajad ei levi oma tekkepiirkonnast väljapoole, mistõttu neid saab üldjuhul kirurgiliselt eemaldada. Pahaloomulised kasvajad (s.o vähktõbi) on võimelised siirdkolletena levima teistesse kudedesse ja organitesse (metastaseeruma) – selline invasiivne omadus muudabki pahaloomulised kasvajad niivõrd ohtlikuks. Vähktõbi moodustab umbes 90% kõigist kasvajate põhjustatud surmadest (Cooper, 1993; Weinberg, 2013). Kasvajad jagunevad päritolu alusel nelja suuremasse rühma: kartsinoomid, sarkoomid, leukeemiad ja lümfoomid. Kartsinoomid pärinevad epiteelirakkudest (naharakkudest, siseelundite kattekoe rakkudest ja näärmerakkudest); sarkoomid sidekoe rakkudest; leukeemiad vereloomerakkudest ning lümfoomid immuunsüsteemi rakkudest. Leidub ka vähitüüpe, mis ei ole klassifitseeritavad ühtegi eelmainitud rühma, nagu näiteks teratoomid. (Cooper, 1993; Weinberg, 2013).

Olulisel kohal on muutused kasvajarakkude geenides ja geeniekspressioonis. Kasvajaid põhjustavad geenid jaotuvad kahte rühma: onkogeenid ja kasvaja supressorgeenid. Onkogeenides tekkinud mutatsioonid võivad põhjustada rakkude kontrollimatu jagunemise. Kasvaja supressorgeenid kodeerivad raku jagunemist kontrollivaid valke ja nende häirimisel võib samuti tekkida rakkude kontrollimatu jagunemine. Üldiselt sõltub kasvaja moodustumine, kasv ja metastaseerumine mutatsioonide kuhjumisest erinevates geenides, mitte ainult üksikust proto-onkogeeni aktivatsioonist või kasvaja supressorgeeni inaktivatsioonist (Heinaru, 2012). Paljud onkogeenide poolt kodeeritavad valgud (onkovalgud) aktiveerivad samu rakusiseseid signaaliülekannderadu nagu eksogeensed mitogeenid (raku jagunemist esilekutsuvad stiimulid

väliskeskkonnast). Seega tagavad sellised onkovalgud kasvajakaraku autonoomse jagunemise ehk kasvajakarakk ei vaja enam jagunemiseks stiimuleid väliskeskkonnast (Weinberg, 1991).



Joonis 1. Kasvajatele omased tunnused (ingl. *Hallmarks of Cancer*; Hanahan ja Weinberg, 2011).

Veel üheks erinevuseks kasvajate ja normaalse koe vahel on kasvajate mikrokeskkond, mida iseloomustavad muutused veresoonekonnas, madal pH ning muutused hapniku- ja verevarustuses ning ainevahetuses. Väiksemates ($1\text{--}2\text{ mm}^3$) soliidtuumorites ei ole angiogenees ehk veresoonte moodustumine vajalik, sest hapnik ja toitained jõuavad kõigi kasvajakarakkudeni difusiooni kaudu (Danhier, 2010). Seevastu suuremates kasvajates peab käivituma angiogenees, sest hapniku difusioonipiir tahketes kasvajates on umbes $150\text{ }\mu\text{m}$ ja hüpoksia hakkab tekkima juba $100\text{ }\mu\text{m}$ kaugusel veresoontest (Helmlinger jt, 1997). Angiogeneesi käivitumine sõltub vastavat geeniekspressiooni mõjutavate pro- ja antiangiogeensete faktorite tasakaalust. Proangiogeensete faktorite hulka kuuluvad näiteks füsioloogilised stiimulid nagu hüpoksia ja mitmesugused aktivaatormolekulid, nagu näiteks vaskulaarne endoteeli kasvufaktor (VEGF), epidermaalne kasvufaktor (EGF) ja fibroblastide kasvufaktorid (FGF-id). Antiangiogeensete faktorite hulka kuuluvad näiteks trombospondiin-1, angiostatiin ja endostatiin (Bergers ja Benjamin, 2003).

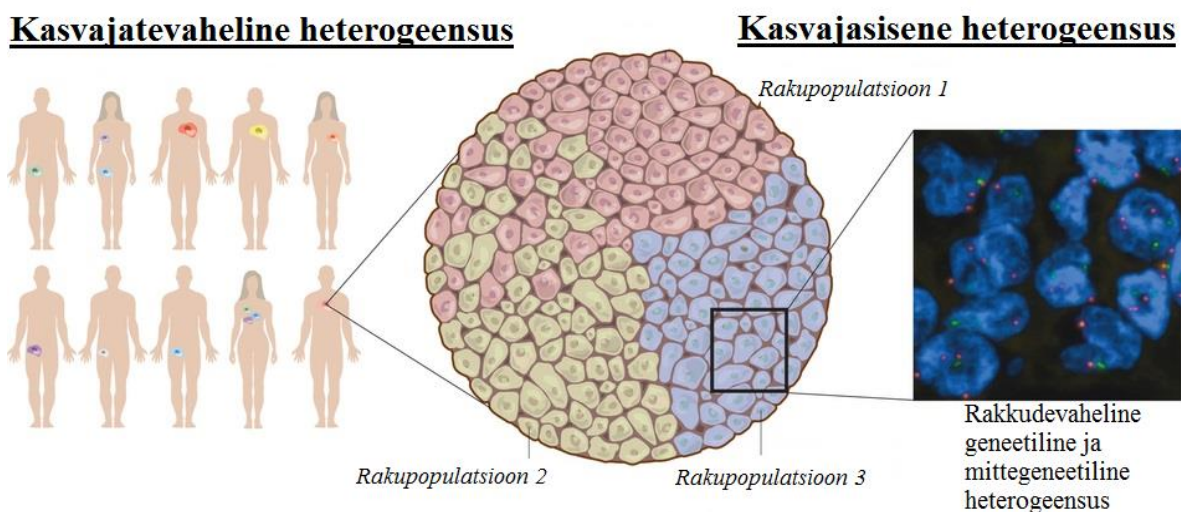
Kasvaja veresooned erinevad tavalistest veresoontest. Kasvaja veresooni katavad luminaalselt endoteelirakud, mis on ebakorrapärase paigutusega ning paljudel juhtudel puudub peritsüütide kiht. Lisaks on suurenenud veresoonte läbilaskvust suurendavate faktorite, nagu näiteks bradükiniini, lämmastikoksiidi, VEGF-i ja prostaglandiinide, tootmine. Kasvajate lümfiringe on defektne ning seetõttu on häiritud jääkainete ja interstitsiaalse vedeliku väljaviimine kasvajakoe (Greish, 2007). Nendest kasvaja veresoonestikule ja ainevahetusele omastest nähtustest tulenevalt koguneb tahketesse kasvajatesse suuremas kontsentratsioonis makromolekule kui normaalsesse kudedesse – seda nimetatakse EPR (ingl. *enhanced permeability and retention*) efektiks (Maeda jt, 2000).

Kasvajate esinemissagedus on tõusuteel – maailma rahvaarv kasvab, keskmine vanus suureneb ja elustiilimuutused toovad endaga kaasa kasvajaid soodustavate riskifaktorite osakaalu suurenemise. Aastal 2012 diagnoositi maailmas 14,1 miljonit uut kasvajajuhtumit ja kasvajatesse suri 8,2 miljonit inimest (Torre jt, 2015). Kasvajatest tingitud suremus on viimase kahe kümnendi jooksul langenud 23%, kuid sellest hoolimata on kasvajad teiseks peamiseks surmapõhjuseks USA-s ja üks peamisi maailmas. Ameerika Vähiliit ennustab, et 2016. aastal sureb ainuüksi USA-s kasvajatesse ligemale 600 000 inimest. Selliste andmete valguses tuleb jätkata kasvajauuringuid nii alusteaduslikul kui ka kliinilisel tasemel, lootuses leida uudseid ravimeid ja ravimeetodeid (Siegel jt, 2016).

1.2 *In vitro* kasvajamudelid

Esimene rakukultuuris kasvatatud vähirakuliin oli HeLa – emakakaelavähi rakuliin, mille rakud saadi 1951. aastal patsiendilt Henrietta Lacks (Scherer, 1953). Sellest ajast saati on inimpäritolu kasvajatest tuletatud rakuliinid leidnud ulatuslikku kasutust kasvajate katsemudelitena. Juba 1980. aastate lõpus pani USA Riiklik Vähiinstituut kokku 60 inimpäritolu kasvaja rakuliinist koosneva paneeli (NCI60), mida kasutatakse vähivastaste ravimite *in vitro* testimisel. NCI60 abil testitakse aastas kuni 3000 vähivastase molekuli tsütotoksilist aktiivsust. NCI60 projektist on välja kasvanud suurim avalikkusele kättesaadav andmebaas, mis koondab rakupõhiseid vähivastaste ravimitega läbiviidud katseid (Shoemaker, 2006; [1]).

Kuigi kasvajaliinid erinevad tegelikult nii inimese normaalsetest kudedest kui ka kasvajakoest, leiavad need kliiniliste kasvajaproovide vähese kättesaadavuse ja keeruliste kultiveerimistingimuste tõttu laialdast kasutust (Ross jt, 2000). Erinevustest hoolimata näidati 51 rinnavähi rakuliiniga teostatud uuringus, et testitud rakuliinidel on olemas enamik genoomsetest ja transkriptsioonilistest iseärasustest, mida seostatakse vastavate primaarsete vähitüüpidega. Lisaks korreleerus uuritud rakuliinide ravivastus kliinilises praktikas täheldatuga (Neve jt, 2006). On ilmne, et kultuuris kasvatatavad rakuliinid on kohanenud tehiskeskkonnaga, mistõttu ei pruugi sellised rakuliinid enam piisavalt hästi esindada vastavaid primaarseid kasvajaid (Borrell, 2010).



Joonis 2. Kasvajatevaheline ja kasvajatesisene heterogeensus. Rakupopulatsioonid kasvajas võivad ruumiliselt seguneda või püsida lahus. Erinevad rakupopulatsioonid võivad omada ka erisugust mikrokeskkonda või veresoonestikku. Parempoolisel pildil on punase märgisega tähistatud kromosoom 2, rohelisega kromosoom 18 ja sinisega DNA; näha on geneetilist ja mittegeneetilist varieeruvust rakkude vahel (Burrell jt, 2013).

Genoomika kiire areng on võimalikuks teinud rakuliinide ulatusliku võrdluse primaarsete kasvajatega, andes väärtuslikku informatsiooni rakuliinide päritolu ja omaduste kohta (Beroukchim, 2010; Domcke jt, 2013). Suuremahulise genotüüpiseerimise tulemusena leidis kinnitust rohkem kui 30 aastat tagasi esitatud hüpotees, mille kohaselt ühe kasvaja rakupopulatsioonid erinevad üksteisest geneetiliselt ja fenotüübiliselt olulisel määral. Sellist nähtust nimetatakse kasvajasiseseks heterogeensuseks (Heppner, 1984; Marusyk ja Polyak, 2010). Lisaks esineb suur heterogeensus erinevatest algkudedest pärit kasvajatüüpide vahel;

samuti võivad üksteisest olulisel määral erineda kahe indiviidi sama tüüpi kasvaja genoomne ja rakupopulatsiooniline struktuur ei pruugi olla püsiv ja võib ajas muutuda, näiteks vähiravi mõjul (Gillet jt, 2011; Borrell jt, 2013).

Genoomiuuringud võimaldavad tulevikus paremini mõista ravimite toimemehhanismide seoseid konkreetsete kasvaja geneetilise profiiliga ning leida paremaid *in vitro* kasvajamudeleid (Sharma jt, 2011; Ahmed jt, 2013). Viimasel ajal on üha enam tähelepanu hakatud pöörama kolmemõõtmelistele *in vitro* kasvajamudelitele, mida nimetatakse sferoidideks või organoidideks. Sellised rakukogumid imiteerivad kasvaja mikrokeskkonda paremini kui kahemõõtmeline rakukultuur (Mehta jt, 2012; Hoffmann jt, 2015).

1.3 Kasvaja biomarkerid

Biomarker on tunnus, mille abil on võimalik tuvastada normaalset või haiguslikku bioloogilist protsessi või farmakoloogilist ravivastust ning mis on objektiivselt mõõdetav. Kasvaja kontekstis on biomarker aine või protsess, mis aitab kindlaks teha kasvaja tüübi ja olemasolu organismis. Kasvaja biomarkerid võivad olla geneetilised, epigeneetilised, proteoomsed või glükoomsed (Mishra ja Verma, 2010). Genoomika, proteoomika ja molekulaarpatoloogia arenguga on kaasnenud paljude biomarkerite avastamine, kuid nende kliinilisse kasutusse võtmine on raskendatud. Avastatud biomarkerid peavad kliinilisse kasutusse jõudmiseks läbima pika ja keerulise valideerimisprotsessi. Lisaks on veel hulgaliselt praktilisi takistusi, miks biomarkerid ja suunatud kasvavaravi potentsiaal ei ole veel täies mahus realiseerunud (Ludwig ja Weinstein, 2005).

Üheks biomarkerite väljundiks on nende kasutamine ravieesmärgil. Näiteks on tuvastatud, et mitmetes kasvajates on tekkinud mutatsioonid ERBB ehk EGF-i retseptoris, mis võimaldab selle retseptori inhibeerimist kasvajaspetsiifiliselt. Mitmed ERBB inhibiitorid on jõudnud ka kliinilisse kasutusse (Arteaga ja Engelman, 2014). Teise väljundina võidakse kasvaja biomarkereid kasutada näiteks terapeutiliste või diagnostiliste ühendite kasvajaspetsiifilisuse tõstmiseks. Selles kontekstis on eriti kasulikud kasvaja veresoonte seintes avalduvad biomarkerid, sest need on vereringlusesse viidud molekulidele hõlpsasti ligipääsetavad. Selliste

biomarkerite hulka kuuluvad näiteks teatud kasvajatüüpides üleekspresseeritud $\alpha_v\beta_3$ - ja $\alpha_v\beta_5$ -integriinid, p32 ja neuropiliin-1 (Ruoslahti jt, 2010; Willmore jt, 2016).

1.3.1 Neuropiliin-1

Neuropiliinid on 130–140 kDa suurused multifunktsionaalsed membraanseoselised valgud, mis seovad muuhulgas 3. klassi semaforiine ja VEGF-i. On näidatud, et neuropiliinid mängivad olulist rolli mitmetes protsessides, nagu näiteks närvisüsteemi areng, immuunvastuse kujunemine, angiogenees ja lümfangiogenees (Ellis, 2006).

Neuropiliinid on üleekspresseeritud paljudes kasvajates ja kasvajate rakuliinides. Neuropiliin-1 (NRP-1) üleekspressiooni on näidatud eesnäärme-, rinna-, põie-, neeru-, soole-, pankrease-, naha-, munasarja- ja kopsuvähis. Eriti kõrge on NRP-1 ekspressioon eesnäärmekartsinoomi rakkudes (Soker jt, 1998; Willmore jt, 2016). Arvatakse, et NRP-1 mõju kasvajate eluvõimelisusele, angiogeneesile ja migratsioonile tuleneb NRP-1 osalusest semaforiinide ja VEGF-i signaaliülekandeadades (Rizzolio ja Tamagnone, 2011). Lisaks on NRP-1 oluline inimese endoteelirakkude adhesioonivõime tagamiseks (Murga jt, 2005).

NRP-1 täpsed toimemehhanismid on veel teadmata. Ühe hüpoteesi kohaselt võimendab NRP-1 kaasretseptorina VEGF-i (ja teiste NRP-1 ligandide) seondumist põhiretseptorile (Soker jt, 2002). Teise hüpoteesi kohaselt ei piirdu NRP-1 funktsioon ainult kaasretseptori rolliga, vaid NRP-1 omab ka primaar-retseptorist sõltumatut aktiivsust (Pan jt, 2007).

NRP-1 kõrge ekspressioon assotsieerub kliiniliste vähkkasvajate suure invasiivsuse ja metaseerumisega. NRP-1 üleekspressioon korreleerub näiteks eesnäärmevähi agressiivsuse ja angiogeneesi määraga (Latil jt, 2000). Loomkatsed on näidanud, et NRP-1 üleekspressioon soodustab mikroveresoonte tiheduse ja endoteelirakkude proliferatsiooni suurenemist kasvajates, soodustades kasvajate kasvu, angiogeneesi ja invasiooni ning vähendades kasvajarakkude apoptoosi (Miao jt, 2000). NRP-1 on sihtmärgiks mitmetele suunatud vähiravi platvormidele (Teesalu jt, 2009; Kumar jt, 2014).

1.4 Suunatud kasvajaravi

Kasvajaravi kolm põhilist suunda on kirurgia, kiiritusravi ja keemiaravi. Ravi valik sõltub kasvaja tüübist, haiguse staadiumist, saadaval olevast tõendusmaterjalist ravi efektiivsuse kohta ja raviarsti või patsiendi eelistusest. Keemiaravi on enamike kasvajatüüpide ravi alustalaks. Kasvajaravis võidakse kasutada ühte või mitut (s.o kombineeritud keemiaravi) ravimit kas omaette või koos kirurgia ja/või kiiritusraviga. Kasutusel olevaid keemiaravimeid on võimalik toimemehhanismi alusel jagada seitsmesse rühma: alküülivad ained, antratsükliinid, alkaloidid, antimetaboliidid, topoisomeraasi inhibiitorid, hormonaalsed ained ja kasvajaspetsiifilised ained (Newman ja Blackhall, 2010).

Enamik kasutusel olevatest keemiaravimitest on suhteliselt ebaspetsiifilised ning nende kasutamisega kaasneb süsteemne toksilisus ja tõsised kõrvalmõjud. Seetõttu on järjest enam tähelepanu hakatud pöörama ravimite väljatöötamisele, mis on oma toimemehhanismi või kudedesse jaotumise tõttu kasvajaspetsiifilised (Danhier jt, 2010). Näiteks ägeda lümfotsüütilise leukeemiaga patsientide elumus 5 aasta lõikes on viimase 35 aasta jooksul suunatud vähiravi kasutuselevõtu tõttu tõusnud 29% võrra (Siegel jt, 2016).

Edusammud kasvajate molekulaarsete mehhanismide uurimisel on teinud võimalikuks defektsete molekulide ja signaaliradade spetsiifilise ravi, mis aitab parandada kasvajaravi efektiivsust ja vähendada kõrvalmõjusid (Sawyers, 2004). Uue suunana kasutatakse suunatud kasvajaravis nanoosakestel põhinevaid platvorme, mis kannavad seotud ravimi eelistatult kasvajakoesse. Nanosüsteeme saab vastavalt vajadusele disainida, näiteks muutes nanoosakeste suurust, kuju, poorsust, tsirkulatsiooniaega, kinnitunud molekulide arvu jne. Lisaks on nanosüsteemide abil võimalik parandada transporditavate ainete (ravimite) farmakoloogilisi omadusi, näiteks lahustuvust ja biosobivust (Kanapathipillai jt, 2014).

Suunatud kasvajaraviks kasutatakse eritüübilisi nanoosakesi: polümeeridel põhinevaid nanoosakesi, liposoomi, viiruseid / viiruse-sarnaseid osakesi ning erinevate metallide nanoosakesi (Wang jt, 2008; Willmore jt, 2016). Nanoosakeste bioühilduvuse, biojaotuvuse ja farmakokineetiliste omaduste parandamiseks funktsionaliseeritakse neid molekulidega, mis aitavad vältida mononukleaarseid fagotsüüte. Üheks levinud meetodiks on polüetüleenglükooli

(PEG) rühmade lisamine (pegüleerimine; Albanese jt, 2012). Samuti on oluline ka nanoosakeste pinnalaengu optimeerimine (Xiao jt, 2011).

Üheks suurimaks väljakutseks suunatud kasvajaravis on selliste moodulite väljatöötamine, mis suudavad selektiivselt ravimiga laaditud nanosakesed kasvajakoesse toimetada (Brannon-Peppas ja Blanchette, 2012). Afiinsusel põhinevaks aktiivseks suunamiseks kinnitatakse nanoosakestele kasvajaspetsiifiline molekul, nagu näiteks kasvajakude penetreeriv peptiid (ingl. *tumor penetrating peptide*; vt alljärgnevat peatükki). Kasvajaspetsiifiline molekul tagab ravimiga varustatud nanoosakese rakku sisenemise (Ferrari, 2005; Teesalu jt, 2009).

1.4.1 Kasvajakude penetreerivad peptiidid

Üheks kasvajaspetsiifiliste afiinsusligandide puudujäägiks on nende vähene kasvajakoe penetreerimisvõime, mis tähendab, et transporditavad ravimid ei jõua veresoontest kaugemal asuvate kasvajarakkudeni. Hiljuti iseloomustatud kasvajakude penetreerivad peptiidid aga seonduvad hõlpsasti ligipääsetavatele biomarkeritele kasvajarakkudel ja kasvaja endoteelirakkudel ning suudavad tungida sügavale ekstravaskulaarsesse kasvajakoesse (Ruoslahti jt, 2010).

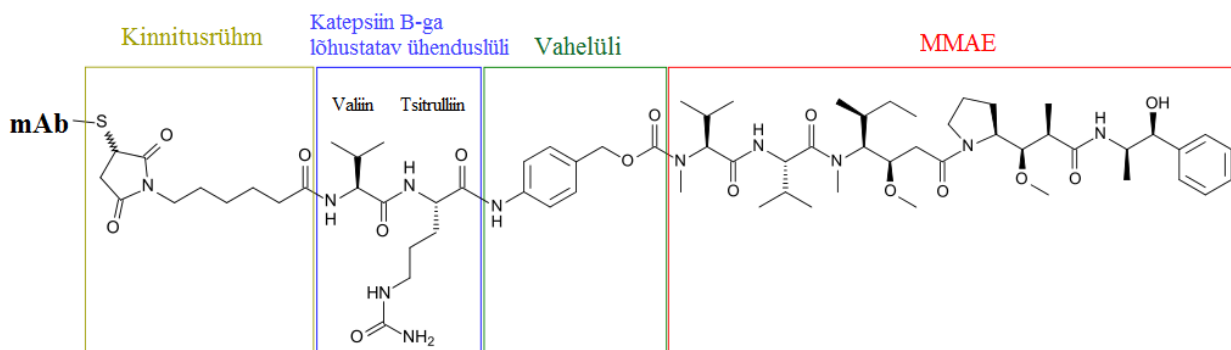
Teesalu jt (2009) leidsid *in vivo* faagiraamatukogude skriinimise tehnoloogiat kasutades peptiidid, mis seonduvad NRP-1 retseptori vahendusel eesnäärmevähk-rakkudele. Tuvastati, et skriiningus esile tulnud peptiididel on ühine motiiv, mis on seondumise tagamiseks oluline: R/KXXR/K. Eriti efektiivseks osutus RXXR-tandemmotiiviga peptiid RPARPAR (ehk RPAR). Edasiste uuringute käigus leiti, et antud motiiv on aktiivne siis, kui see asub polüpeptiidahela C-terminaalses otsas – seega nimetati motiiv C-terminaalseks elemendiks (CendR; ingl. *C-end Rule*; Teesalu jt, 2009). Peptiidjärjestusse peidetud krüptilisi CendR-motiive on võimalik aktiveerida vähikoest pärinevate proteaasiga, nagu näiteks urokinaasiga (Braun jt, 2016).

CendR-motiiviga peptiidid seonduvad NRP-1 retseptori b1b2 domeenile, mis aktiveerib CendR-ülekanalite teed (ingl. *CendR pathway*). On näidatud, et CendR-peptiidid sisenevad rakkudesse endotsütoosi teel ja tegu on aktiivse transpordiga (Sugahara jt, 2009). Küllastatav CendR-ülekanal erineb tavapärasestest endotsütoosiradadest ja meenutab rohkem

makropinotsütoosi, kusjuures CendR-ülekanderaja aktiivsus ja NRP-1 ekspressioon suureneb toitainete vaeguses. Arvatakse, et CendR-ülekanderaja võib olla mõeldud toitainete transpordiks, mis seletaks CendR-peptiidide kasvajakoe penetreerimisvõimet. Ühtlasi tähendab see, et CendR/NRP-1 süsteem võiks eriti kasulik olla ravimite transportimisel halva veresoonestikuga soliidtuumoritesse, milles tuleb toitaineid transportida sügavale kasvajakoesse (Pang jt, 2014). Lisaks suudavad CendR-peptiidid rakkudesse sisenemisel ja kasvajakoe penetreerimisel endaga kaasa võtta nii konjugeeritud kui ka koosmanustatud molekule (Teesalu jt, 2013).

1.4.2 Monometüülauristatiin E

Monometüülauristatiin E (MMAE) on kõrge aktiivsusega dolastatiin 10 sünteetiline analoog, mis blokeerib tubuliini polümerisatsiooni ja pärsib seeläbi rakkude jagunemist. Kolmekümne üheksa inimese kasvaja rakuliiniga (sh eesnäärmevähk) läbi viidud uuring näitas, et mitte ükski neist ei olnud MMAE-le resistentne. Lisaks leiti antud uuringus, et MMAE IC_{50} väärtus on $3,2 \pm 0,5$ nM, mis tähendab, et MMAE on 197 korda potentssem kui tuntud vähivastane ravim doksorubitsiin (IC_{50} väärtus 631 nM; (Doronina jt, 2003).



Joonis 3. Monoklonaalse antikeha (mAb) ja MMAE konjugaadi keemiline struktuur. MMAE kinnitamiseks antikehale on kasutatud ühenduslül, mis sisaldab valiin-tsitrulliini (Val-Cit) peptiidsidet. Vahelülina on paraaminobensoehape ning kinnitusrühm koosneb maleimiidist ja kaproonhapest [2].

Tugeva mittespetsiifilise tsütotoksilise mõju tõttu ei sobi MMAE kasutamiseks keemiaravis – sellepärast on välja töötatud monoklonaalsest antikehast (mAb) ja MMAE-st koosnevad suunatud MMAE konjugaadid. MMAE ja antikeha ühendatakse omavahel peptiidsete ühenduslülidega, saades näiteks mAb-valiin-tsitrulliini-MMAE konjugaadi. Valiin-tsitrulliini (Val-

Cit) peptiidside on lõhustatav lüsoosomaalse proteaasiga katepsiin B, mille ekspressioon ja aktiivsus on suurenenud mitmetes kasvajatüüpides, sealhulgas ka eesnäärmevähk (Koblinski jt, 2000; Doronina jt, 2003). Üks selline mAb-MMAE konjugaat on brentuximab vedotin (Adcetris), mis sai 2011. aastal Hodgkini lümfoomi ja süsteemse anaplastilise suurerakulise lümfoomi raviks kasutamiseks USA toidu- ja raviameti (FDA) heakskiidu ([3]; Younes jt, 2012).

EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

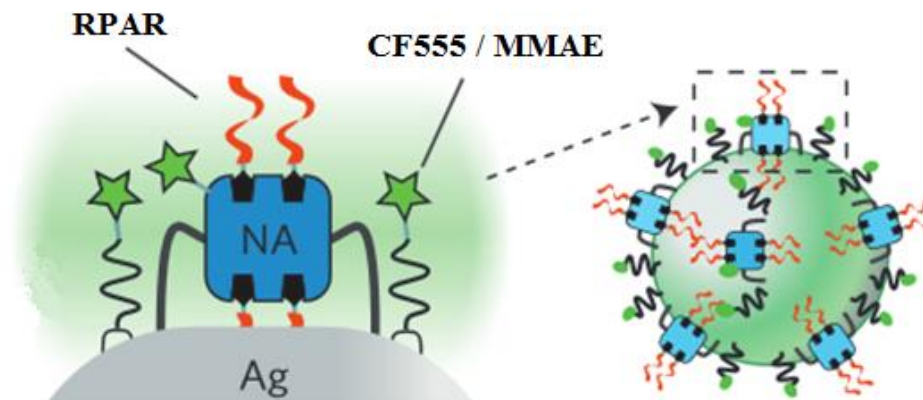
Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli uurida vähiravimiga monometüülauristatiin E (MMAE) ja CendR-peptiidiga RPARPAR (RPAR) funktsionaliseeritud hõbeda nanoosakeste (AgNP) mõju NRP-1 üleekspressseeriva PPC-1 eesnäärmevähkide rakuliinile. Lisaks uuriti nimetatud nanoosakeste omadusi ning võimet NRP-1 vahendusel seonduda PPC-1 rakkudele ja neisse siseneda. Väljaarendatud transportsüsteem on mudeliks järgnevatele projektidele.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Hõbeda nanoosakeste süntees ja funktsionaliseerimine

Hõbeda nanoosakesed sünteesiti vastavalt Lee ja Meiseli avaldatud tsitraadimeetodile (Lee ja Meisel, 1982). Kasutatud materjalid: AgNO_3 (Sigma-Aldrich), trinaatriumtsitraatdihüdraat (Sigma-Aldrich), ülipuhas vesi eritakistusega $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ (Milli-Q); klaasnõud puhastati väävelhappe (Sigma-Aldrich) ja vesinikperoksiidi (Sigma-Aldrich) lahusega.

Hõbeda nanoosakeste funktsionaliseerimine põhineb Brauni jt (2014) avaldatud artiklil, kusjuures kasvajaspetsiifilise peptiidina kasutati biotiin-aminoheksaanhappe-RPARPAR-i (RPARPAR ehk RPAR; TAG Copenhagen) ja fluorestsentsmärgisena CF555-NHS-i (Biotium). Hõbedast südamik kaeti vastavalt avaldatud meetodile neutravidiin-PEG(5k)-tiooli (Thermo Scientific / JenKem) ja lipoehape-PEG(1k)-amiiniga (Nanocs). Vajadusel asendati RPAR D-biotiiniga (Sigma-Aldrich). Tsütotoksilisuse katsete jaoks asendati fluorestsentsmärgis NHS-glutamiin-valiin-tsitruilliin-p-aminobensoüülkarbonüül-monometüülauristatiin E-ga (edaspidi MMAE; ALB Technology).



Joonis 4. Funktsionaliseeritud Ag-nanoosakeste skeem. Hõbedast (AgNP) südamikuga nanoosakesed on kaetud neutravidiin-PEG-tiooliga (NA), millele kinnitub biotinüleeritud kasvajaspetsiifiline peptiid (RPAR), ja lipoehape-PEG-amiiniga, millele kinnitub fluorestsentsmärgis (CF555) või NHS-Val-Cit-MMAE (MMAE) (Braun jt, 2014).

MMAE või CF555-märgise kinnitamiseks lisati Ag-nanoosakeste põhilahusele vastav 2 mM lahust veevabas dimetüülsulfoksiidis (DMSO; Sigma-Aldrich) ja segu inkubeeriti üleöö 4 °C juures (pimedas). Kinnitamata MMAE/CF555 eemaldamiseks koguti nanoosakesed mikrotsentrifuugiga 5424 R (Eppendorf) (3500 g, 10 min) põhja, supernatant eemaldati ja lisati PBS, mis sisaldas 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich) (PBST); osakeste uuesti lahusesse viimiseks sonikeeriti tuube lühiajaliselt ultrahelivannis RK 52 (Bandelin Electronic). Pesuprotseduuri korrati 3 korda. RPAR-i (või D-biotiini) kinnitamiseks lisati vastavat 2 mM lahust PBS-is ja segu inkubeeriti vähemalt 30 minutit toatemperatuuril (pimedas). Nanoosakesi pesti üks kord ja säilitati PBST-s lahustatuna 4 °C juures (pimedas). Enne Ag-nanoosakeste kasutamist sonikeeriti lahust lühiajaliselt.

2.2.2 Hõbeda nanoosakeste iseloomustus

Transmissioonelektronmikroskoopia (TEM) kujutiste saamiseks kasutati transmissioonelektronmikroskoopi Tecnai 10 (Philips). Ag-nanoosakeste proovid lahjendati PBS-is ja asetati spetsiaalsele vaskvõrgustikuga TEM-i preparaadialusele Cu-300 (Pacific Grid-Tech).

Nanoosakeste suurust ja elektrokineetilist potentsiaali (ξ-potentsiaali) mõõdeti Zetasizer Nano ZSP (Malvern) analüsaatoriga. Osakeste suuruse mõõtmine põhineb valguse dünaamilise

hajumise (DLS; ingl. *dynamic light scattering*) meetodil; elektrokineetilise potentsiaali mõõtmise aluseks on laseripõhine Doppleri mikroeletroforees (ingl. *laser Doppler microelectrophoresis*). Proovid lahjendati PBS-is ja mõõtmised teostati 20 °C juures. Suuruse mõõtmisel kasutati polüstüreenist küvette (Sigma-Aldrich) ja elektrokineetilise potentsiaali mõõtmisel spetsiaalseid kapillaarküvette DTS1070 (Malvern).

Ravimi kogust ühe Ag-nanoosakese kohta mõõdeti kaudselt, NHS-seondumiskohtade kaudu. Selleks tehti 6-[fluorestseiin-5(6)-karboksamido]-heksanoehape-NHS-ist (FAM) seerialahjendused kontsentratsioonide vahemikus 1–1000 nM ja kolm lahjendust Ag-nanoosakeste põhilahusest. Lahjendi ja tühiproovina kasutati spetsiaalset hõbeda söövitustlahust (ingl. *etching*), mis valmistati vastavalt Brauni jt artiklis (Braun jt, 2014) avaldatud protseduurile (detailsem kirjeldus peatükis „Konfokaalmikroskoopia“). Fluorestsentsi intensiivsust mõõdeti mikrotiiterplaadilugejaga FlexStation 3 (Molecular Devices) ja NHS-FAM-i mõõtmisel saadud väärtustega joonestati MS Excelis graafik, millele lisati lineaarne trendijoon. Ag-nanoosakeste proovide mõõtmisel saadud tulemused sobitati trendijoon valemisse, et leida NHS-seondumiskohtade arv, mis tõlgendati ümber ravimi koguseks nanoosakese kohta.

2.2.3 Rakukultuur

PPC-1 (inimese eesnäärmekartsinoom), PPC-1-GFP (inimese eesnäärmekartsinoom, mis ekspresseerib GFP valku) ja M21 (inimese melanoom) rakke (ATCC) kasvatati kõrge glükoosisisaldusega Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) söötmes (PAA), kuhu oli lisatud 10% veiselooteseerumit (PAA), penitsiliini (Gibco) ja streptomütsiini (Gibco). Rakke kasvatati ühekihilise kultuurina 75 cm² suurustes rakukultuuri pudelites (BD Biosciences), mida hoiti rakukultuuriinkubaatoris 37 °C juures ja 5% CO₂ keskkonnas. Rakkude lahtivõtmiseks kasutati ensüümivaba PBS-põhist raku dissotsiatsioonipuhvrit (Gibco) ja pesemiseks PBS-puhvrit.

2.2.4 Konfokaalmikroskoopia

Konfokaalmikroskoopia katseteks kasvatati rakke 24 tundi 24-süvendilistes mikrotiiterplaatides (Corning), kuhu olid lisatud 12 mm diameetriga katteklaasid (Marienfeld-Superior). Pärast 37 °C DMEM söötmega pesemist lisati proovid täpsustatud kontsentratsioonis ja

rakke inkubeeriti 37 °C juures ja 5% CO₂ keskkonnas üks tund (antikehaga blokeerimise katsetes lisati 10 µg/ml antikeha 15 minutit enne nanoosakesi). Rakke pesti uuesti sooja söötmega ja fikseeriti külma 100% metanooli (BioTop) või 4% paraformaalaldehüüdiga (Sigma-Aldrich) PBS-is. Segakultuuri katses kasvatati rakke pärast proovide lisamist veel 48 tundi. Rakustruktuuride visualiseerimiseks värviti rakke 100-kordselt lahjendatud plasmamembraani värviga CellMask Green või CellMask Deep Red (Thermo Fisher); rakutuumad värviti 1 µg/ml 4',6-diamidino-2-fenüülindooliga (DAPI; Sigma-Aldrich). Viimase etapina pandi alusklaasidele (Karl Hecht) tilk sulundusvedelikku Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences), mille peale asetati katteklaasid mikrotiiterplaadi süvenditest. Pikaajalisemaks säilitamiseks fikseeriti katteklaasid pärast sulundusvedeliku kuivamist küünelakiga.

Rakuväliste Ag-nanoosakeste lahustamiseks kasutati spetsiaalset hõbeda söövituslahust, mis ei läbi rakumembraani. Söövituslahus valmistati vastavalt varasemalt avaldatud meetodile (Braun jt, 2014). Söövituslahus valmistati iga kord värskena pimedas hoitud 200 mM Na₂S₂O₃ (Sigma-Aldrich) ja K₃Fe(CN)₆ (Sigma-Aldrich) põhilahustest. Töölahuses oli mõlema reagenti kontsentratsioon 10 mM ja lahjendina kasutati PBS-i. Rakke inkubeeriti 5 minutit töölahusega ja seejärel pesti 2–3 korda PBS-iga.

Pildid tehti konfokaalmikroskoobiga FV1200MPE (Olympus), kasutades UPlanSApo 60x/1.35na või 10x/0.4na objektiivi (Olympus). Piltide töötlemiseks kasutati tarkvara FluoView FV10-ASW 4.0 (Olympus). Mikroskoobipiltide kvantifitseerimiseks kasutati vabavara ImageJ koos täiendava vabavaralise paketiga FIJI. Rakkude eluvõimelisuse analüüsimiseks konfokaalmikroskoopia piltide alusel mõõdeti rakkude poolt kaetud pindala. Saadud pindala jagati nanoosakestega töötlemata kontrolli pindalaga ja korrutati saja protsendiga.

2.2.5 Läbivoolutsütomeetria

Läbivoolutsütomeetria katsete jaoks võeti rakud plaadilt lahti ensüümivaba PBS-põhise raku dissotsiatsioonipuhvriga (Gibco), jaotati 1,5 ml tuubidesse, pesti 37 °C söötmega ja tsentrifuugiti (250 g, 5 min) põhja. Supernatant eemaldati ja rakkudele lisati täpsustatud kontsentratsioonis nanoosakesed DMEM söötmes (antikehaga blokeerimise katsetes lisati 10 µg/ml antikeha 15 minutit enne nanoosakesi). Rakke inkubeeriti nanoosakestega rotaatoril 37 °C

juures üks tund. Antikehadega tehtud katses kasutati rakuväliste Ag-nanoosakeste lahustamiseks spetsiaalset söövituslahust (Braun jt, 2014). Seejärel pesti rakke 2–3 korda 37 °C DMEM söötmega ja rakud suspendeeriti PBS-is. Proove mõõdeti läbivoolutsütomeetriga BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences) ja andmeanalüüs teostati samanimelise tarkvaraga.

2.2.6 AgNP-MMAE-RPAR-i seondumine NRP-1 b1b2 domeenile

AgNP-MMAE-RPAR nanoosakeste spetsiifilist seondumist NRP-1 retseptorile demonstreeriti magnetiliste nikkel-nitriilotriäädikhappega (Ni-NTA) agarosikerakestega (Qiagen), millele kinnitati histidiinmärgisega metsiktüüpi või mutantne rekombinantne b1b2 domeen NRP-1 valgust (Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute). Selleks lahjendati valgud seondumispuhvis, mis koosnes 1 M NaCl-ist (Sigma-Aldrich), 5 mM imidasoolist (Sigma-Aldrich) ja 0,05% Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) 50 mM pH 7,0 Tris puhvis, kontsentratsioonini 0,5 mg/ml ja lisati magnetkerakestele. Pärast ühetunnist toatemperatuuril inkubeerimist rotaatoril Multi Bio RS-24 (Biosan) pesti kerakesi magneti abil 2 korda seondumispuhvriga, kuhu oli lisatud 0,1% veise seerumi albumiini (BSA; PAA). Seejärel inkubeeriti magnetkerakesi rotaatoril toatemperatuuril üks tund AgNP-MMAE-RPAR nanoosakestega. Pärast seondumispuhvriga pesu eemaldati kinnitunud nanoosakesed elueerimispuhvriga, mis koosnes 400 mM imidasoolist, 300 mM NaCl-ist, 0,1% BSA-st ja 0,05% IGEPAL CA-630 PBS-is, ning hõbeda sisaldust eluaadis mõõdeti UV-Vis spektrofotomeetriga Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

2.2.7 Märgisevaba rakkude eluvõimelisuse analüüs

Rakkude eluvõimelisuse mõõtmiseks valitud ajavahemikus kasutati instrumenti xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosciences) koos spetsiaalsete 16-süvendiliste mikrotiiterplaatidega E-Plate 16 (ACEA Biosciences). Seade mõõdab rakkude proliferendumist, morfoloogiat ja kinnitumist märgisevabalt ning reaalselt. Mikrotiiterplaatide süvendite põhjad on kaetud kullast mikroelektroodidega, mis juhtivad tekitatud elektrivoolu. Plaadile kinnitunud rakud pärsivad mikroelektroodide vahelist juhtivust ehk suurendavad takistust, mida on võimalik tõlgendada erinevateks rakuparameetriteks. Instrumendiga xCELLigence tehtud mõõtmiste kontekstis tähistab termin „rakkude eluvõimelisus“ edaspidi rakukasvu indeksit, mis hõlmab

rakkude eluvõimelisust, morfoloogilisi muutuseid ja adhesiooni substraadile. Instrumenti hoiti rakukultuuriinkubaatoris 37 °C juures ja 5% CO₂ keskkonnas.

Plaatide süvenditesse pipeteeriti DMEM rakusööde ja mõõdeti taustsignaal. Seejärel lisati süvenditesse rakud. Plaadid viidi tagasi instrumenti, rakkudel lubati 24 tundi kinnituda ja seejärel lisati proovid (antikehaga blokeerimisel lisaks 10 µg/ml antikeha 15 minutit enne proovi). Pärast ühetunnist inkubatsiooni pesti rakke kaks korda 37 °C DMEM söötmega ja plaadid viidi tagasi instrumenti. Mõõtmise lõpetati vähemalt 63 tunni möödudes (alates proovi lisamisest). Saadud andmeid analüüsiti RTCA kasutajaliidesega ja graafikud joonestati MS Excelis.

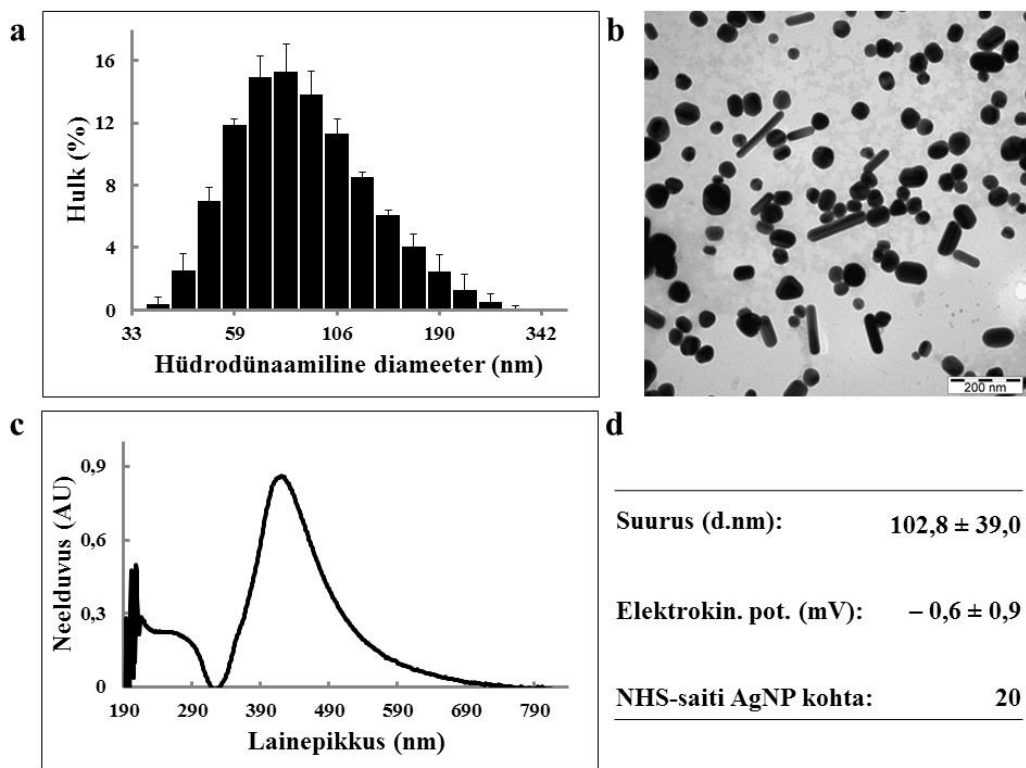
2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Ag-nanoosakeste iseloomustus

Ag-nanoosakeste neelduvust mõõdeti UV-Vis spektrofotomeetriliselt. Leiti, et neelduvuse maksimum on lainepikkusel 415 nm ja spektri sabaosa ulatub lainepikkuseni 750 nm (**joonis 5c**). Sellest tulenevalt on raskendatud mõningate tavapäraste tsütotoksilisuse analüüside kasutamine, kus neelduvust mõõdetakse samas vahemikus, nagu näiteks 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiidiga (MTT) rakuproliferatsiooni analüüs (mõõtmine lainepikkusel 570 nm). Hüdrodünaamilise diameetri mõõtmiseks kasutati DLS-meetodit, millega saadi Ag-nanoosakeste keskmiseks hüdrodünaamiliseks diameetriks 103 ± 39 nm (**joonis 5a**). TEM-iga tehtud piltidel Ag-nanoosakestest nähti sarnase suurusega nanoosakesi, mis kinnitas DLS-meetodiga saadud tulemusi. Lisaks oli TEM-i piltidelt näha, et Ag-nanoosakesed olid erineva kuju ja suurusega (**joonis 5b**), mis seletab suhteliselt suurt standardviga DLS-meetodiga mõõtmisel. Samas selline heterogeensus on rakendatud sünteesimeetodi jaoks ootuspärane.

Ag-nanoosakeste elektrokineetilise potentsiaali (ζ -potentsiaal) mõõtmise tulemuseks saadi $-0,611 \pm 0,888$ mV (**joonis 5d**). Ag-nanoosakestele RPAR-i ja MMAE lisamisel elektrokineetiline potentsiaal ei muutunud ($-0,653 \pm 0,883$ mV), kuigi RPAR-i netolaeng on +2 (MMAE on neutraalne). Elektrokineetilise potentsiaali samaks jäämine on seletatav sellega, et suurem osa Ag-nanosakeste pinnast on kaetud umbes 60 kDa suuruste neutraalsete neutraviidinide ja umbes 1 kDa suuruste lipohape-PEG-molekulidega, mis varjestavad RPAR-

iga lisanduva laengu. Üldiselt on kirjanduse andmeil nanoosakeste kergelt negatiivne pinnalaeng *in vivo* (Xiao jt, 2011) ja *in vitro* (Slowing jt, 2006) kasutamiseks sobiv.

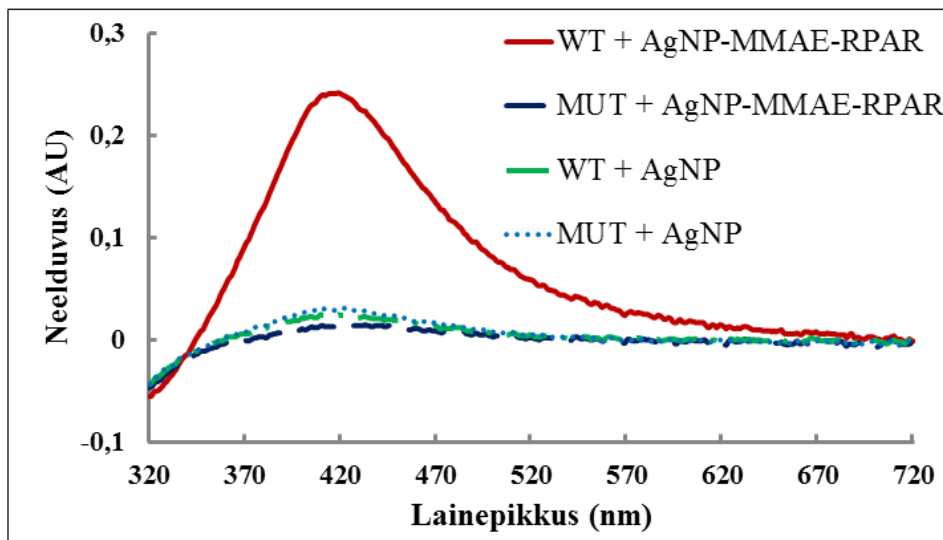


Joonis 5. (a) DLS-meetodiga mõõdetud Ag-nanoosakeste protsentuaalne jaotus hüdrodünaamilise diameetri alusel. Keskmise hüdrodünaamiline diameeter on 103 ± 39 nm; veapiirid tähistavad standardviga ($n = 3$). (b) TEM kujutis Ag-nanoosakestest. Mõõtlõik: 200 nm; suurendus: 93 000 x. (c) Ag-nanoosakeste Uv-Vis spekter. (d) Leitud AgNP-MMAE-RPAR-i parameetrid. Suurus tähistab DLS-iga mõõdetud keskmist hüdrodünaamilist suurus ($n = 3$); elektrokineetiline potentsiaal on kergelt negatiivne ($n = 3$); ühel Ag-nanoosakesel on umbes 20 NHS-rühma kinnituskoha, mis vastab MMAE kinnituskohadele.

Lisaks arvutati kaudselt MMAE molekulide arv Ag-nanoosakese kohta ja sellest tulenevalt ka AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioon MMAE järgi. Fluorestseiini (FAM) seerialahjenduste fluorestsentsi intensiivsuse väärtuste põhjal konstrueeriti standardkõver ($R^2 = 0,9998$). Saadud võrrandisse sisestati AgNP-FAM-iga saadud väärtused ja hõbeda nanoosakeste kontsentratsiooni põhjal leiti, et ühel Ag-nanoosakesel on keskmiselt 20 NHS-rühma seondumiskohta (**joonis 5d**). Üks ühele arvestusega tähendab see, et AgNP-MMAE-RPAR

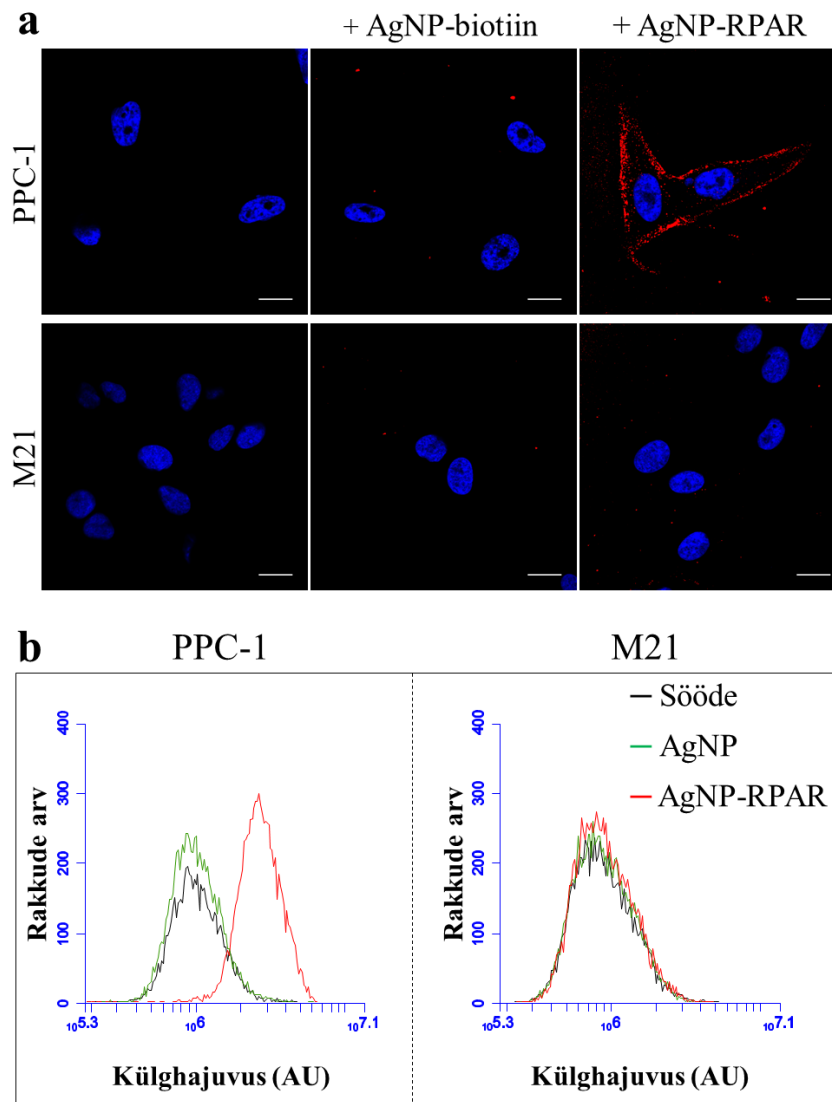
osakeste kontsentratsioon MMAE järgi on 20 korda suurem kui hõbeda nanoosakeste enda kontsentratsioon. Saadud tulemused on heas kooskõlas kaastöötajate saadud tulemustega.

2.3.2 AgNP-MMAE-RPAR-i NRP-1-vahendatud seondumine PPC-1 rakkudele



Joonis 6. AgNP-MMAE-RPAR-i seondumine NRP-1 valgu b1b2 domeenile. Magnetkerakestele kinnitati heksahistidiinmärgisega NRP-1 metsiktüüpi (WT) või mutantne (MUT) b1b2 domeen, kerakesi inkubeeriti rotaatoril nanoosakestega (1,5 nM) üks tund ja pesti seondumispuhvriga; valgud ja seondunud nanoosakesed eemaldati elueerimispuhvriga ning UV-Vis spektrofotomeetriga mõõdeti hõbeda nanoosakeste neelduvust eluaadis. Kontrollvalguna kasutati mutantset b1b2 domeeni (MUT), kontrollosakestena Ag-nanoosakesi (AgNP).

AgNP-MMAE-RPAR-i NRP-1-vahendatud seondumise uurimiseks viidi läbi katse magnetiliste Ni-NTA agarosikerakestega, kuhu kinnitati NRP-1 valgu b1b2 domeen. Kontrollvalguna kasutati NRP-1 retseptori mutantset b1b2 domeeni, kuhu seondumist ei peaks toimuma. Eelnevalt on demonstreeritud, et RPAR-i seondumiskohaks on just nimelt b1b2 domeen (Teesalu jt, 2013). Tulemustest oli selgesti näha, et AgNP-MMAE-RPAR seondus metsiktüüpi b1b2 domeenile, kuid mutantsele valgule ja kontrollosakestega seondumist ei toimunud (**joonis 6**).



Joonis 7. AgNP-RPAR-i seondumine PPC-1 (NRP-1 positiivsed) ja M21 (NRP-1 negatiivsed) rakkudele. **(a)** Konfokaalmikroskoopia: rakke inkubeeriti rakukultuuris CF555-märgistatud (punane) nanoosakestega (1,5 nM) üks tund, pesti sooja söötmega, fikseeriti 4% PFA-ga ja rakutuumad värviti DAPI-ga (sinine). Mõõtlõik: 20 μ m. **(b)** Läbivoolutsütomeetria: rakke inkubeeriti üks tund suspensioonis rotaatoril nanoosakestega (1,5 nM), pesti sooja söötmega, suspendeeriti PBS-is ja läbivoolutsütomeetriga mõõdeti külghajuvust. Rakkudele seondunud ja neisse sisenenud nanoosakeste tõttu suureneb külghajuvuse väärtus. AU tähistab külghajuvuse suhtelist ühikut (ingl. *arbitrary unit*) ja x-telg on logaritmskaalas.

Järgmisena tehti seondumiskatse NRP-1 valku üleekspresseeriva eesnäärmevähirakuliiniga PPC-1; kontrollina kasutati M21 melanoomirakke, mis NRP-1 ei ekspresseeri (Teesalu jt, 2009). Kvalitatiivne katse tehti konfokaalmikroskoobiga (**joonis 7a**), kus Ag-

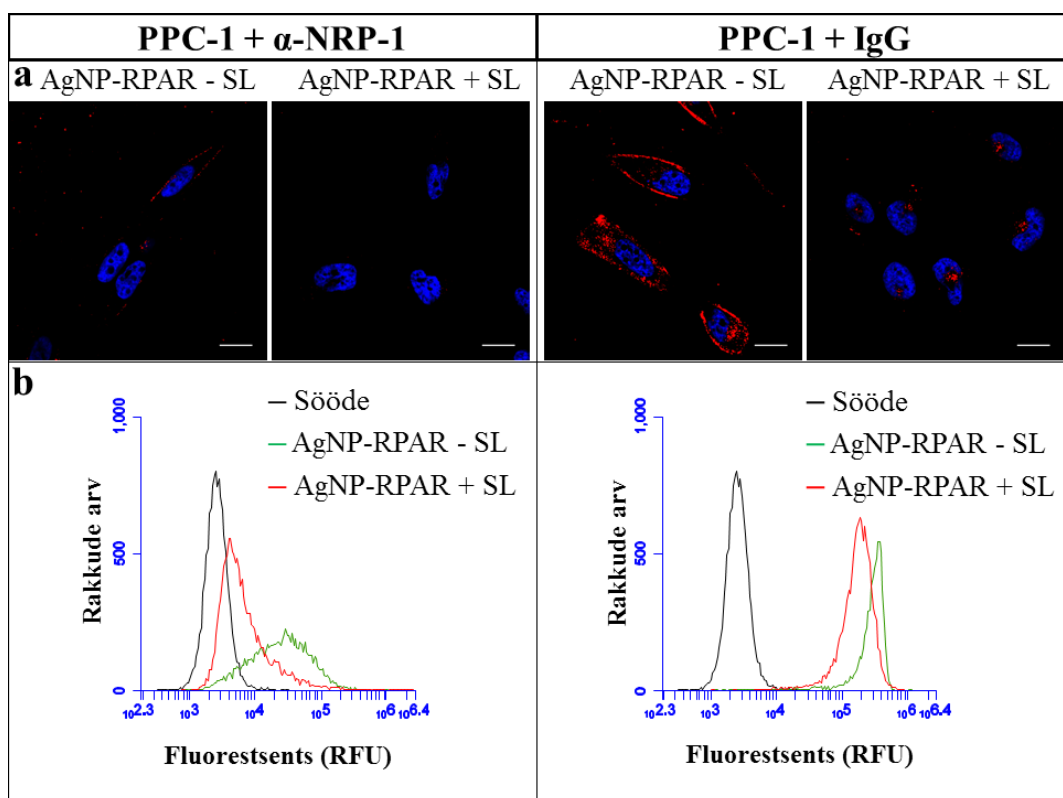
nanoosakeste visualiseerimiseks asendati MMAE fluorestsentsmärgisega CF555 ja kvantitatiivne katse läbivoolutsütomeetriga (**joonis 7b**). Läbivoolutsütomeetria võimaldab külghajuvuse (ingl. *side scatter*) mõõtmisega eristada rakke, kuhu on seondunud või sisenenud Ag-nanoosakesed, mis muudavad valgushajuvust ja rakusisest tihedust.

Tulemustest (**joonis 7**) oli selgesti näha AgNP-RPAR-i spetsiifilist seondumist PPC-1 rakkudele. Konfokaalmikroskoobi kujutisel joonistus PPC-1 rakkudele lisatud AgNP-RPAR nanoosakeste signaalist välja rakumembraani kontuur, mis viitas sellele, et suurem osa nanoosakestest oli seondunud rakumembraanile või asusid selle läheduses. Lisaks oli näha rakku sisenenud AgNP-RPAR-i osakesi. Katse tulemused on kooskõlas NRP-1 b1b2 domeeniga tehtud katsega (**joonis 6**) ja ühtlasi kinnitab see hüpoteesi, et CF555-märgise asendamine MMAE-ga ei mõjuta Ag-nanoosakeste seondumist NRP-1 retseptorile.

2.3.3 AgNP-MMAE-RPAR-i NRP-1-vahendatud sisenemine PPC-1 rakkudesse

AgNP-RPAR-i rakkudesse sisenemise NRP-1 retseptorist sõltuvuse uurimiseks kasutati NRP-1 vastast antikeha, mis blokeerib RPAR-i seondumiskoha NRP-1 retseptoril. Pärast NRP-1 vastase antikehaga blokeerimist lisati rakkudele AgNP-RPAR-i. Kahe erineva meetodiga läbi viidud katsete tulemused (**joonis 8**) näitasid, et AgNP-RPAR-i seondumine PPC-1 rakkudele vähenes blokeeriva NRP-1 vastase antikeha (kuid mitte kontroll IgG) lisamisel. AgNP-RPAR-i teatud määral seondumise põhjuseks oli arvatavasti AgNP-RPAR-i multivalentisusest tulenev funktsionaalse afiinsuse suurenemine, mis võimaldas AgNP-RPAR-il teatud osa antikehadest välja konkureerida.

Rakusiseste AgNP-RPAR osakeste tuvastamiseks kasutati spetsiaalset hõbeda söövitustlahust (Braun jt, 2014). Söövitustlahuse kasutamisel vähenes taustsignaal ja mikroskoopia tulemustest (**joonis 8a**) oli näha, et NRP-1 vastase antikehaga blokeeritud rakkudesse sisenes AgNP-RPAR väga vähesel määral. Läbivoolutsütomeetria tulemus (**joonis 8b**) kinnitas mikroskoopia katses nähtut: söövitustlahusega töödeldud blokeerimata NRP-1 retseptoriga PPC-1 rakkudes eristusid selgesti AgNP-RPAR-i osakesed, mis olid rakku sisenenud. Need tulemused kinnitasid, et AgNP-RPAR seondub PPC-1 rakkudele NRP-1 retseptori vahendusel ja siseneb rakkudesse.



Joonis 8. AgNP-RPAR-i seundumine NRP-1 vastase antikehaga (α -NRP-1) blokeeritud PPC-1 rakkudele. Kontrollina kasutati IgG antikeha. Spetsiaalne hõbeda söövitushus (SL) lahustab rakuvälised Ag-nanoosakesed ja vähendab taustsignaali. **(a)** Konfokaalmikroskoopia: rakke inkubeeriti rakukultuuris antikehaga (10 μ l/ml) 15 minutit, seejärel lisati CF555-märgistatud (punane) nanoosakesed (1,5 nM), inkubeeriti üks tund, pesti sooja söötmega, fikseeriti 4% PFA-ga ja rakutuumad värviti DAPI-ga (sinine). Mõõtlõik: 20 μ m. **(b)** Läbivoolutsütomeetria: rakke inkubeeriti rakukultuuris antikehaga (10 μ l/ml) 15 minutit, seejärel lisati nanoosakesed (1,5 nM), inkubeeriti suspensioonis rotaatoril üks tund, pesti sooja söötmega, suspendeeriti PBS-is ja mõõdeti läbivoolutsütomeetriga fluorestsentsi intensiivsust (585/40 nm). RFU (ingl. *relative fluorescence unit*) on fluorestsentsi intensiivsuse suhteline ühik ja x-telg on logaritmskaalas.

2.3.4 AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioonist sõltuv mõju PPC-1 ja M21 rakkudele

Leidmaks optimaalset AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsiooni, millel oleks suurim võimalik tsütotoksiline mõju PPC-1 rakkudele, ilma et esineks ebaspetsiifiline tsütotoksiline mõju M21 kontrollrakuliinile, teostati kõigepealt konfokaalmikroskoopia põhine pilootkatse,

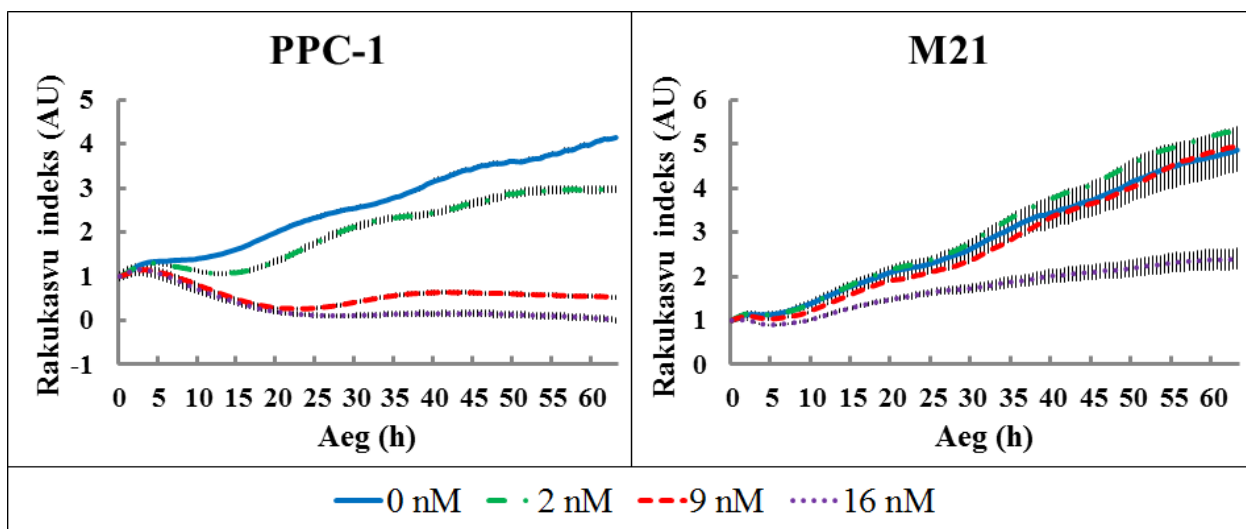
milles rakkudele lisati kolmes kontsentratsioonis (0, 33, 100 nM ravimi järgi) AgNP-MMAE-RPAR-i. Selle katse tulemustest (**lisa 1**) nähti, et 33 nM kontsentratsiooni juures oli elus umbes 40% PPC-1 rakkudest, kuid hakkas ilmema ka ebaspetsiifiline tsütotoksiline mõju M21 rakkudele. AgNP-MMAE-RPAR-i ebaspetsiifiline mõju M21 rakkudele tulenes ilmselt nanoosakeste taustseondumisest süvendiplaadile ja võimalikust agregeerumisest, mida on nanoosakeste suure kontsentratsiooni puhul täheldatud ka varasemates katsetes. Rakkude eluvõimelisuse hindamine konfokaalmikroskoopiaga andis liiga palju varieeruvaid tulemusi, mistõttu otsustati kasutada alternatiivset meetodit. Selleks meetodiks valiti reaajas märgisevaba rakkude eluvõimelisuse mõõtmist võimaldav xCELLigence'i analüüs.

Seade xCELLigence mõõdab süvendiplaadi põhjas olevate kullast mikroelektroodide abil elektrivoolu juhtivust. Plaadile kinnitunud rakud pärsivad mikroelektroodide vahelist juhtivust, mille väljundiks on rakukasvu indeks (ehk rakkude eluvõimelisus). Seadmega uuriti AgNP-MMAE-RPAR-i mõju PPC-1 ja M21 rakkudele 63 tunni jooksul (**joonis 9**). AgNP-MMAE-RPAR-i tsütotoksiline mõju hakkas ilmema paar tundi pärast rakkudele lisamist. Tõenäoliselt oli selleks ajaks rakkudesse sisenenud piisaval hulgal mürgiga laetud nanoosakesi ja oli toimunud Val-Cit ühenduslüli lõhustumine lüsoosomaalse katepsiin B-ga, mille tulemusena vabanes tsütotoksiline MMAE.

Joonisel 9 on AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioonid antud MMAE järgi. AgNP-MMAE-RPAR-i tsütotoksiline mõju PPC-1 rakkudele ilmnes juba alates 2 nM AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioonist ja 16 nM kontsentratsiooni puhul oli tsütotoksiline mõju kõige suurem. Pärast 24 tundi jõudis 16 nM vastav kõver platoole, millest võis järeldada, et selleks ajaks oli valdav enamik rakkudest kas surnud või jagunemisvõimetud (MMAE on antimitootiline). AgNP-MMAE-RPAR-i 9 nM kontsentratsiooni puhul oli sama efekti näha 10 tundi hiljem, kusjuures kuni 24. tunnini oli mõju võrdne 16 nM kontsentratsiooniga. Selle 10-tunnise perioodi jooksul oli 9 nM kontsentratsiooni puhul näha, et teatud osa PPC-1 rakupopulatsioonist suutis lühiajaliselt taastuda. Vaatamata väiksele viivitusele ei suutnud PPC-1 rakud jagunemisvõimet säilitada ja 34. tunnist hakkas vastav kõver uuesti langema (**joonis 9**).

Kontrollrakuliiniga M21 läbi viidud katse tulemused näitasid, et AgNP-MMAE-RPAR ei omanud 9 nM kontsentratsiooni puhul rakkude eluvõimelisusele ja jagunemisele olulist mõju,

kuid 16 nM kontsentratsiooni juures toimus hüppeline langus (**joonis 9**). Kahe rakuliiniga tehtud katsete tulemuste analüüsimisel otsustati, et sobiv AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioon edasisteks katseteks on 9 nM.



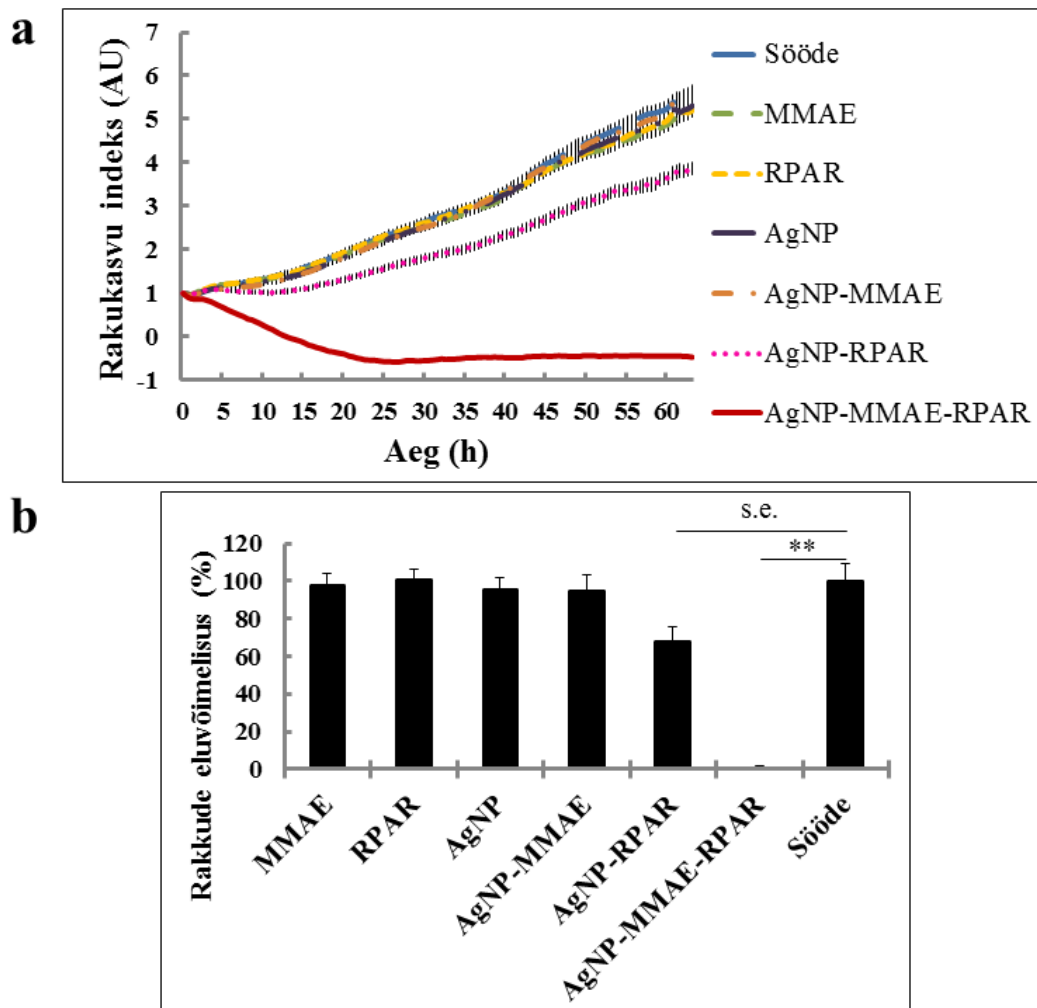
Joonis 9. AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioonist sõltuv mõju PPC-1 ja M21 rakkude eluvõimelisusele 63 tunni jooksul pärast rakkudele lisamist. Rakke kasvatati 24 tundi rakukultuuris, seejärel inkubeeriti AgNP-MMAE-RPAR-iga üks tund, pesti sooja söötmega ja kasvatati vähemalt 63 tundi, mõõtes rakkude eluvõimelisust iga 30 minuti järel seadmega xCELLigence. Arvutatud AgNP-MMAE-RPAR-i IC_{50} väärtus: 1,75 nM; arvutatud PPC-1 jagunemisaeg: $33,4 \pm 0,7$ h ja M21 jagunemisaeg: $28,2 \pm 0,2$ h. AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioonid on antud ravimi järgi; leitud optimaalne AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioon: 9 nM. Veapiirid tähistavad standarddiga igas mõõtmispunktis ($n = 4$). AU tähistab suhtelist ühikut.

Joonisel 9 esitatud tulemuste põhjal arvutati välja PPC-1 ja M21 rakuliinide jagunemisajad. PPC-1 rakkude jagunemisajaks saadi $33,4 \pm 0,7$ tundi ja M21 jagunemisajaks $28,2 \pm 0,2$ tundi, mis vastab kirjanduses esitatud andmetele (Brothman jt, 1989). PPC-1 rakkudega teostatud katse põhjal arvutati AgNP-MMAE-RPAR-i IC_{50} väärtus: 1,75 nM. Siinkohal tuleks silmas pidada, et antud IC_{50} väärtus ei ole absoluutne ja sõltub muu hulgas kasutatavast rakuliinist, analüüsimeetodist ja katse ülesehitusest. Kuna xCELLigence'i tsütotoksilisuse analüüsis kasutatakse algandmetena rakkude süvendiplaadile kinnitumisega kaasnevat juhtivuse muutust, siis mõjutavad tulemusi ka rakkude substraadilt lahti tulemine ja morfoloogilised muutused, mitte ainult otsene rakusurm.

2.3.5 AgNP-MMAE-RPAR-i tsütotoksiline mõju PPC-1 rakkudele

Uurimaks AgNP-MMAE-RPAR-i tsütotoksilist mõju lähemalt, viidi läbi katse, kus PPC-1 rakkudele lisati ainult söödet, vaba MMAE-d, vaba RPAR-i, Ag-nanoosakesi, MMAE-ga Ag-nanoosakesi, RPAR-iga Ag-nanoosakesi ja nii MMAE kui ka RPAR-iga Ag-nanoosakesi. AgNP-MMAE-RPAR-i tsütotoksiline mõju oli statistiliselt oluline (p-väärtus: 0,00135; **joonis 10**) ning kontrollidest mõjutas PPC-1 rakkude eluvõimelisust ainult AgNP-RPAR kontroll, mis oli mõnevõrra üllatuslik. Vaatamata sellele, et AgNP-RPAR-i tsütotoksiline mõju 24 tunni ajapunktis oli statistiliselt ebaoluline (**joonis 10b**), oli joonisel 10a siiski näha, et AgNP-RPAR-i kõvera tõus oli väiksem kui ülejäänud kontrollidel. See andis alust arvata, et AgNP-RPAR mõjutab NRP-1 kaudu rakkude eluvõimelisust.

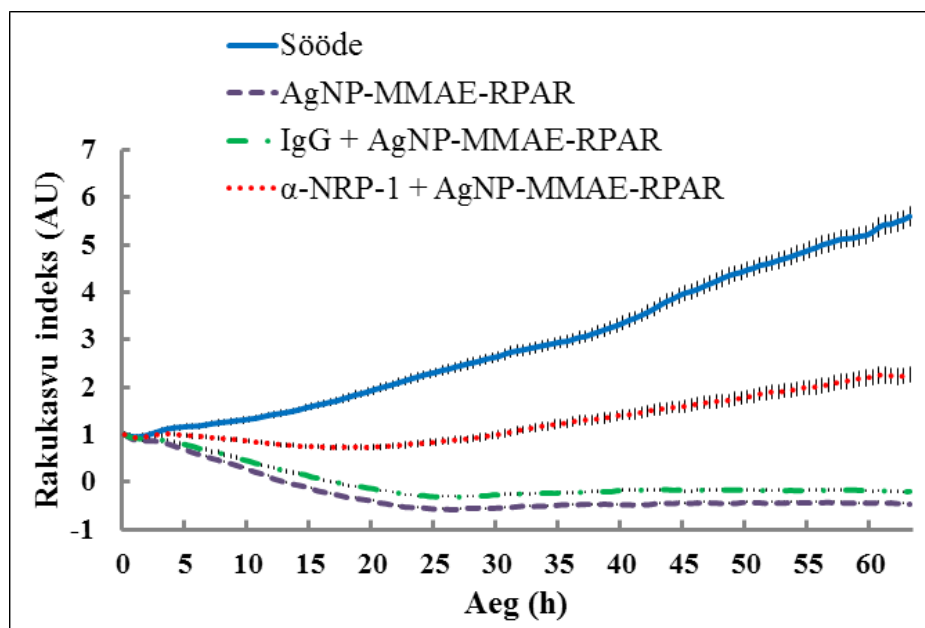
Kirjanduse põhjal on teada, et NRP-1 retseptor vahendab muu hulgas rakkude jagunemises ja kinnitumises olulist rolli mängivaid signaale (Murga jt, 2005; Rizzolio ja Tamagnone, 2011). Seega pärsib NRP-1 blokeerimine rakkude jagunemis- ja adhesioonivõimet ja seetõttu võiks arvata, et AgNP-RPAR käitus NRP-1 antagonistina. Samas oli näha, et vabal RPAR-il sellist mõju ei ole – seda võib põhjendada AgNP-RPAR-i multivalentsus, mis suurendab funktsionaalset afiinsust ja vähendab dissotsiatsioonikiirust võrreldes vaba RPAR-iga. Seega võib vaba RPAR kiiremini vabastada NRP-1 retseptori, mis võimaldab NRP-1 funktsionaalsuse võrdlemisi kiiret taastumist, kuid AgNP-RPAR blokeerib NRP-1 retseptorit piisavalt kaua, et mõjutada rakkude eluvõimelisust. Pakutud hüpoteesi tõestamiseks oleks vaja teha täiendavaid katseid, näiteks katse, kus PPC-1 rakkudele lisatakse ainult NRP-1 vastane antikeha. Juhul kui NRP-1 vastasel antikehal oleks sarnane mõju, kinnitaks see, et PPC-1 rakkude eluvõimelisuse vähenemise põhjuseks on AgNP-RPAR-i antagonistlik mõju.



Joonis 10. AgNP-MMAE-RPAR-i mõju PPC-1 rakkude eluvõimelisusele. AgNP-MMAE-RPAR-il oli tugev tsütotoksiline mõju, mõnevõrra üllatuslikult näis AgNP-RPAR käituvat NRP-1 antagonistina. Rakke kasvatati 24 tundi rakukultuuris, seejärel inkubeeriti AgNP-MMAE-RPAR-i või kontrolliga üks tund, pesti sooja söötmega ja kasvatati vähemalt 63 tundi, mõõtes rakkude eluvõimelisust iga 30 minuti järel seadmega xCELLigence. AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioon MMAE järgi oli 9 nM ja kontrollide kontsentratsioonid olid ekvivalentsed. Veapiirid tähistavad standardviga igas mõõtmispunktis ($n = 3$). **(a)** AgNP-RPAR-MMAE ja kontrollide mõju PPC-1 rakkudele 63 tunni jooksul pärast rakkudele lisamist. AU tähistab suhtelist ühikut. **(b)** Rakkude protsentuaalne eluvõimelisus nanoosakestega töötlemata kontrolli suhtes 24 tunni ajapunktis. Veapiirid tähistavad standardviga ($n = 3$). Horisontaalsed jooned viitavad p-väärtusele, kus s.e. tähistab statistiliselt ebaolulist ja ** on $\leq 0,01$ (AgNP-MMAE-RPAR-i p-väärtus: 0,00135).

Joonisel 10 esitatud tulemustest oli näha, et MMAE üksi ei olnud 9 nM kontsentratsiooni puhul PPC-1 rakkudele tsütotoksiline, kuigi kirjanduse andmeil on MMAE IC_{50} väärtus $3,2 \pm 0,5$ nM (Doronina jt, 2003). Erinevuse kirjanduse andmetega põhjustas ilmselt teistsugune katse ülesehitus: pärast ühetunnist inkubeerimist MMAE, RPAR-i või nanoosakestega pesti rakke üks kord söötmega. Suunatud osakesed, nagu näiteks AgNP-RPAR ja AgNP-MMAE-RPAR, jõuavad selleks ajaks sihtmärgiga seonduda ja rakku siseneda, kuid suunamata MMAE mõju ei jõua veel avalduda.

Edasi mõõdeti AgNP-MMAE-RPAR-i mõju NRP-1 vastase antikehaga blokeeritud PPC-1 rakkude eluvõimelisusele ja jagunemisele (**joonis 11**). IgG kontrolliga PPC-1 rakkude eluvõimelisus vastab positiivsele kontrollile, milleks antud juhul oli ainult AgNP-MMAE-RPAR.



Joonis 11. AgNP-MMAE-RPAR-i mõju NRP-1 vastase antikehaga (α -NRP-1) blokeeritud PPC-1 rakkude eluvõimelisusele 63 tunni jooksul pärast rakkudele lisamist. NRP-1 vastane antikeha vähendab AgNP-MMAE-RPAR-i seondumist ja võib käituda NRP-1 antagonistina. AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioon MMAE järgi on 9 nM. Kontrollina kasutati IgG antikeha ja veapiirid tähistavad standardviga igas mõõtmispunktis ($n = 3$). AU tähistab suhtelist ühikut.

Katse tulemused näitasid, et NRP-1 vastase antikehaga blokeeritud PPC-1 rakkude eluvõimelisus oli oluliselt väiksem kui söötmega kontrollil. Võttes arvesse eelmiste katsete

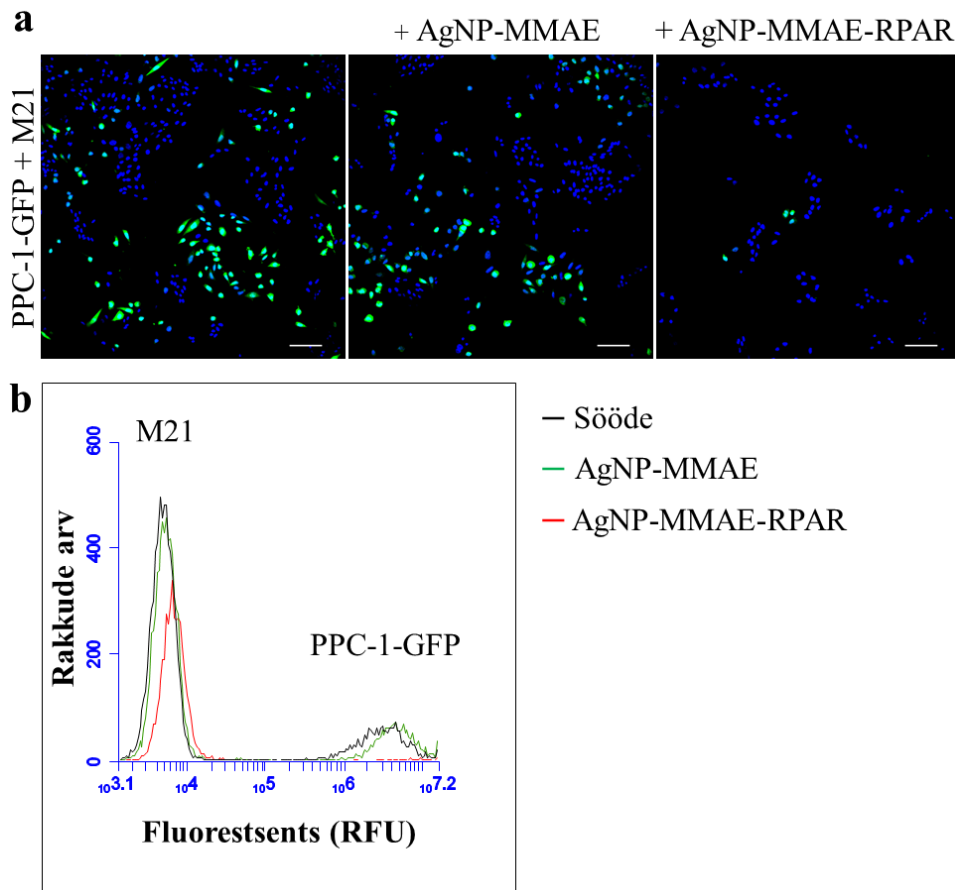
tulemusi (**joonis 8** ja **joonis 10**), võis antud katses nähtud mõju tuleneda kahest erinevast mõjurist. Esiteks võis AgNP-MMAE-RPAR teatud määral NRP-1 vastase antikeha välja konkureerida, võimaldades AgNP-MMAE-RPAR-il NRP-1 retseptorile seonduda ja rakku siseneda. Teiseks võis NRP-1 vastane antikeha toimida NRP-1 antagonistina, pärssides seeläbi rakkude eluvõimelisust. Alternatiivselt on võimalik, et kogu nähtud mõju tulenes AgNP-MMAE-RPAR-ist, mille välistamiseks oleks vaja teha täiendav katse, kus PPC-1 rakkudele lisatakse ainult NRP-1 vastane antikeha. Ühtlasi aitaks selline katse selgust saada AgNP-RPAR-i võimaliku antagonistliku mõju osas, nagu on arutletud eespool.

Eelmainitud katsete tulemused viitavad sellele, et AgNP-MMAE-RPAR-il võib olla topeltmõju: MMAE-st tingitud tugev antimitootiline aktiivsus ja NRP-1 funktsiooni pärssiv mõju. Selline AgNP-MMAE-RPAR-i topeltmõju oleks kasvajaravis eriti kasulik, sest nanoosakesele kinnitatud CendR-peptiid ei muuda süsteemi ainult kasvajaspetsiifiliseks, vaid lisab ka kasvajarakkude eluvõimelisust pärssiva mõju.

2.3.6 AgNP-MMAE-RPAR-i mõju PPC-1 ja M21 segakultuurile

Mikroskoopia ja läbivoolutsütomeetria abil uuriti ka AgNP-MMAE-RPAR-i tsütotoksilist mõju PPC-1 ja M21 rakkude segakultuurile (**joonis 12**). Segakultuur matkib mõnevõrra paremini kasvajat, sest segakultuuris kasvavad sihtmärkrakud teiste rakkudega kõrvuti. Rakkude eristamiseks segakultuuris kasutati GFP valku ekspresseerivat PPC-1 rakuliini. Kontrollina kasutati ainult MMAE-ga Ag-nanoosakesi, mis segakultuurile mõju ei avaldanud.

Mikroskoopia (**joonis 12a**) ja läbivoolutsütomeetria (**joonis 12b**) katse tulemused ühilduvad: AgNP-MMAE-RPAR tapab segakultuuris selektiivselt PPC-1-GFP rakke. Läbivoolutsütomeetria katse tulemuste kvantifitseerimisel leiti, et söötmega kontrollis on PPC-1-GFP rakkude osahulk 21%, AgNP-MMAE-ga kontrollis 20% ja AgNP-MMAE-RPAR-iga oli PPC-1-GFP osahulk ainult 1%. See tähendab, et ühetunnise AgNP-MMAE-RPAR-iga inkubeerimise järel suri 96% sihtmärkrakkudest. Vähesel määral oli märgata ka mõju M21 rakkudele, mille arv oli võrreldes kontrollidega mõnevõrra vähenenud (**joonis 12b**).



Joonis 12. AgNP-MMAE-RPAR-i mõju PPC-1-GFP ja M21 rakkude segakultuurile. Nanoosakeste kontsentratsioon MMAE järgi oli 9 nM. **(a)** Konfokaalmikroskoopia: PPC-1-GFP ja M21 rakke inkubeeriti üheskoos suspensioonis rotaatoril AgNP-MMAE-RPAR-iga üks tund, pesti sooja söötmega, külvati süvendiplaadile, kasvatati 96 tundi, pesti sooja söötmega, fikseeriti 4% PFA-ga ja rakutuomad värviti DAPI-ga (sinine). PPC-1-GFP rakud on rohelised. Mõõtlõik: 100 μ m. **(b)** Läbivoolutsütomeetria: PPC-1-GFP ja M21 rakke inkubeeriti üheskoos suspensioonis rotaatoril AgNP-MMAE-RPAR-iga üks tund, pesti sooja söötmega, suspendeeriti PBS-is ja läbivoolutsütomeetriga mõõdeti fluorestsentsi intensiivsust (533/30 nm). Vasakpoolsed piigid vastavad M21 rakupopulatsioonile ja parempoolsed PPC-1-GFP rakupopulatsioonile. Söötmega kontrollis oli PPC-1-GFP rakkude osahulk 21%, AgNP-MMAE kontrollis 20% ja AgNP-MMAE-RPAR-iga 1%. RFU on fluorestsentsi intensiivsuse suhteline ühik, x-telg on logaritmskaalas.

KOKKUVÕTE

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli uurida vähiravimi MMAE ja CendR-peptiidiga RPARPAR funktsionaliseeritud hõbeda nanoosakeste mõju NRP-1 üleekspresseerivale PPC-1 eesnäärmevähkide rakuliinile *in vitro*. Lisaks uuriti AgNP-MMAE-RPAR-i omadusi, võimet seonduda NRP-1 retseptorile ja siseneda selle vahendusel PPC-1 rakkudesse.

Uurimistöös näidati, et AgNP-MMAE-RPAR seondus spetsiifiliselt NRP-1 retseptorile ja et MMAE lisamine AgNP-RPAR osakestele ei mõjutanud nende seondumisvõimekust. Tsütotoksilisuse märgisevaba mõõtmisega (xCELLigence) leiti optimaalne AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioon, mille puhul tsütotoksiline mõju PPC-1 rakkudele oleks maksimaalne, kuid ei esineks ebaspetsiifilist tsütotoksilisust kontrollrakuliinile. PPC-1 rakkudega teostatud tsütotoksilisuse katsete tulemused näitasid, et 24. tunniks pärast AgNP-MMAE-RPAR-i lisamist olid kõik vähirakud kas surnud või jagunemisvõimetud. Lõpuks uuriti AgNP-MMAE-RPAR-i tsütotoksilist mõju segakultuurile, kus sihtmärkrakud kasvavad kõrvalt ülejäänud rakkudega. Leiti, et AgNP-MMAE-RPAR-i lisamisel suri 96% sihtmärkrakkudest.

Mõnevõrra üllatuslikult leiti, et AgNP-RPAR-il võib olla NRP-1 funktsiooni pärssiv mõju, mis vähendab samuti PPC-1 rakkude eluvõimelisust. See tähendaks, et AgNP-MMAE-RPAR-il on topeltmõju: MMAE-st tingitud antimitootiline aktiivsus ja RPAR-ist tingitud NRP-1 funktsiooni pärssiv mõju. On näidatud, et NRP-1 osaleb signaaliülekanalades, mis mõjutavad kasvaja eluvõimelisust ja angiogeneesi ning vähirakkude migratsiooni – seetõttu oleks AgNP-MMAE-RPAR-i topeltmõju kasvavaravis eriti kasulik. Käesolevas töös väljaarendatud transportsüsteem on mudeliks järgnevatele projektidele.

SUMMARY

Effect of CendR-peptide Targeted Therapeutic Silver Nanoparticles on Prostate Cancer Cells

Allan Tobi

Cancer is a leading cause of death in the world. Conventional chemotherapeutics have high systemic toxicity and serious side-effects. Affinity ligands (peptides, antibodies) can be added to biocompatible nanocarriers coupled with cytotoxic drugs to increase their tumor selectivity.

The aim of the study was to evaluate silver nanoparticles (AgNP) as carriers of cytotoxic compounds to cancer cells. Additionally, experiments were carried out to assure that coupling MMAE to previously developed AgNP-RPAR nanoparticles would not affect their ability to bind to NRP-1 positive cells.

AgNPs were coupled with an antineoplastic agent monomethyl auristatin E (MMAE) and functionalized with CendR peptide RPARPAR (RPAR) that binds to neuropilin-1 (NRP-1) overexpressed in tumors. Coupling of MMAE to AgNP-RPAR did not affect cellular uptake of nanoparticles. To evaluate the cytotoxicity of AgNP-MMAE-RPAR, microscopy- and flow cytometry-based methods, as well as a label-free real-time cell viability assay (xCELLigence) were used. In a mixed culture of PPC-1 and NRP-1 negative M21 cells, treatment with AgNP-MMAE-RPAR selectively killed 96% of the PPC-1 cells whereas the M21 cells were not affected. AgNP-RPAR particles without MMAE payload had a mild negative effect on cell viability, suggesting that AgNP-MMAE-RPAR might additionally act as a NRP-1 antagonist.

The study demonstrates that peptide-targeted AgNPs can be used as carriers for specific delivery of coupled cytotoxic compounds to the cultured cells. In follow-up studies the efficacy of the AgNP platform for *in vivo* targeted anticancer drug delivery will be evaluated.

KIRJANDUSE LOETELU

Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., ... & Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(9), e71.

Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*, 14, 1–16.

Arteaga, C. L., & Engelman, J. A. (2014). ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer cell*, 25(3), 282–303.

Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews cancer*, 3(6), 401–410.

Beroukhi, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., ... & McHenry, K. T. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 463(7283), 899–905.

Borrell, B. (2010). How accurate are cancer cell lines. *Nature*, 463(7283), 858.

Braun, G. B., Friman, T., Pang, H. B., Pallaoro, A., de Mendoza, T. H., Willmore, A. M. A., ... & Reich, N. O. (2014). Etchable plasmonic nanoparticle probes to image and quantify cellular internalization. *Nature materials*, 13(9), 904–911.

Braun, G. B., Sugahara, K. N., Olivia, M. Y., Kotamraju, V. R., Mölder, T., Lowy, A. M., ... & Teesalu, T. (2016). Urokinase-controlled tumor penetrating peptide. *Journal of Controlled Release*, 232, 188–195.

Brothman, A. R., Lesho, L. J., Somers, K. D., Wright, G. L., & Merchant, D. J. (1989). Phenotypic and cytogenetic characterization of a cell line derived from primary prostatic carcinoma. *International journal of cancer*, 44(5), 898–903.

Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J., & Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 501(7467), 338–345.

Phenotypic and cytogenetic characterization of a cell line derived from primary prostatic carcinoma. *International journal of cancer*, 44(5), 898–903.

Cooper, G.M., 1993. *The cancer book: a guide to understanding the causes, prevention, and treatment of cancer*, 1k 6–8. Jones & Bartlett Learning.

Danhier, F., Feron, O., & Pr  at, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 148(2), 135–146.

Domcke, S., Sinha, R., Levine, D. A., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nature communications*, 4.

Doronina, S. O., Toki, B. E., Torgov, M. Y., Mendelsohn, B. A., Cervený, C. G., Chace, D. F., ... & Francisco, J. A. (2003). Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nature biotechnology*, 21(7), 778–784.

Ellis, L. M. (2006). The role of neuropilins in cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 5(5), 1099–1107.

Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 5(3), 161–171.

Gillet, J. P., Calcagno, A. M., Varma, S., Marino, M., Green, L. J., Vora, M. I., ... & Padmanabhan, R. (2011). Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(46), 18708–18713.

Gillies, R. J., Raghunand, N., Karczmar, G. S., & Bhujwala, Z. M. (2002). MRI of the tumor microenvironment. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 16(4), 430–450.

Greish, K. (2007). Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *Journal of drug targeting*, 15(7-8), 457–464.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646–674.

- Heinaru, A. 2012. Geneetika, Tartu Ülikooli Kirjastus, lk 752, 756–757.
- Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., & Jain, R. K. (1997). Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature medicine*, 3(2), 177–182.
- Heppner, G. H. (1984). Tumor heterogeneity. *Cancer research*, 44(6), 2259–2265.
- Hoffmann, O. I., Ilmberger, C., Magosch, S., Joka, M., Jauch, K. W., & Mayer, B. (2015). Impact of the spheroid model complexity on drug response. *Journal of biotechnology*, 205, 14–23.
- Kanapathipillai, M., Brock, A., & Ingber, D. E. (2014). Nanoparticle targeting of anti-cancer drugs that alter intracellular signaling or influence the tumor microenvironment. *Advanced drug delivery reviews*, 79, 107–118.
- Khoo, K. H., Verma, C. S., & Lane, D. P. (2014). Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nature reviews Drug discovery*, 13(3), 217–236.
- Koblinski, J. E., Ahram, M., & Sloane, B. F. (2000). Unraveling the role of proteases in cancer. *Clinica Chimica Acta*, 291(2), 113–135.
- Kumar, A., Huo, S., Zhang, X., Liu, J., Tan, A., Li, S., ... & Han, L. (2014). Neuropilin-1-targeted gold nanoparticles enhance therapeutic efficacy of platinum (IV) drug for prostate cancer treatment. *ACS nano*, 8(5), 4205–4220.
- Latil, A., Bieche, I., Pesche, S., Valeri, A., Fournier, G., Cussenot, O., & Lidereau, R. (2000). VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *International journal of cancer*, 89(2), 167–171.
- Lee, P. C., & Meisel, D. (1982). Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(17), 3391–3395.
- Ludwig, J. A., & Weinstein, J. N. (2005). Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature Reviews Cancer*, 5(11), 845–856.

- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., & Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of controlled release*, 65(1), 271–284.
- Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of controlled release*, 164(2), 192–204.
- Miao, H. Q., Lee, P., Lin, H., Soker, S., & Klagsburn, M. (2000). Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *The FASEB Journal*, 14(15), 2532–2539.
- Mishra, A., & Verma, M. (2010). Cancer biomarkers: are we ready for the prime time?. *Cancers*, 2(1), 190–208.
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., ... & Speed, T. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell*, 10(6), 515–527.
- Newman, W. G., & Blackhall, F. H. (2010). Principles of Cancer Treatment. In *Pharmacogenetics: Making cancer treatment safer and more effective*, 1k 1–9, Springer Netherlands.
- Pan, Q., Chantry, Y., Liang, W. C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., ... & Ross, S. (2007). Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer cell*, 11(1), 53–67.
- Pang, H. B., Braun, G. B., Friman, T., Aza-Blanc, P., Ruidiaz, M. E., Sugahara, K. N., ... & Ruoslahti, E. (2014). The CendR pathway: A novel cell penetration and transcytosis pathway regulated by nutrient availability. *Cancer Research*, 74(19 Supplement), 5406–5406.
- Pergamenschikov, A. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature genetics*, 24(3), 227–235.

- Quackenbush, J. (2006). Microarray analysis and tumor classification. *New England Journal of Medicine*, 354(23), 2463–2472.
- Rizzolio, S., & Tamagnone, L. (2011). Multifaceted role of neuropilins in cancer. *Current medicinal chemistry*, 18(23), 3563–3575.
- Ross, D. T., Scherf, U., Eisen, M. B., Perou, C. M., Rees, C., Spellman, P., ... & Scherer, W. F., Syverton, J. T., & Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of experimental medicine*, 97(5), 695–710.
- Ruoslahti, E., Bhatia, S. N., & Sailor, M. J. (2010). Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *The Journal of cell biology*, 188(6), 759–768.
- Sawyers, C. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature*, 432(7015), 294–297.
- Sharma, S. V., Haber, D. A., & Settleman, J. (2010). Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nature reviews cancer*, 10(4), 241–253.
- Shoemaker, Robert H. "The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen." *Nature Reviews Cancer* 6.10 (2006): 813–823.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2016. *CA: A cancer journal for clinicians*.
- Slowing, I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S. Y. (2006). Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells. *Journal of the American Chemical Society*, 128(46), 14792–14793.
- Soker, S., Miao, H. Q., Nomi, M., Takashima, S., & Klagsbrun, M. (2002). VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *Journal of cellular biochemistry*, 85(2), 357–368.

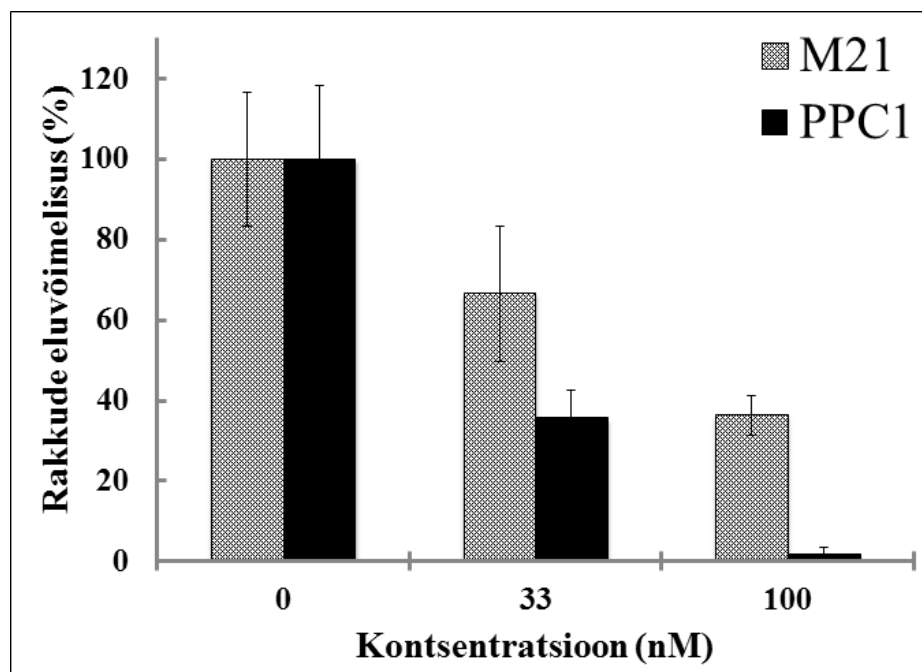
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., & Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92(6), 735–745.
- Teesalu, T., Sugahara, K. N., Kotamraju, V. R., & Ruoslahti, E. (2009). C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16157–16162.
- Teesalu, T., Sugahara, K. N., & Ruoslahti, E. (2013). Tumor-penetrating peptides. *Front Oncol*, 3(216), b3.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87–108.
- Weinberg, R. A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science*, 254(5035), 1138–1146.
- Weinberg, R. A. 2013. The Biology of Cancer, 2. köide, lk 31–45, 53–55 , Garland science.
- Willmore, A. M. A., Simón-Gracia, L., Toome, K., Paiste, P., Kotamraju, V. R., Mölder, T., ... & Teesalu, T. (2016). Targeted silver nanoparticles for ratiometric cell phenotyping. *Nanoscale*.
- Xiao, K., Li, Y., Luo, J., Lee, J. S., Xiao, W., Gonik, A. M., ... & Lam, K. S. (2011). The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*, 32(13), 3435–3446.
- Younes, A., Yasothan, U., & Kirkpatrick, P. (2012). Brentuximab vedotin. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(1), 19–20.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

- [1] https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/ (viimati muudetud 26.08.15)
- [2] <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm268781.htm>
(viimati muudetud 07.04.2014)
- [3] https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMMAE-MAB-conjugate_skeletal.svg
(viimati muudetud 05.11.2014)

LISAD

LISA 1. Tsütotoksilisuse pilootkatse



Lisa 1. AgNP-MMAE-RPAR-i kontsentratsioonist sõltuv mõju PPC-1 (NRP-1 positiivne) ja M21 (NRP-1 negatiivne) rakkudele. Kontsentratsioonid on antud MMAE järgi. Rakke inkubeeriti rakukultuuris AgNP-MMAE-RPAR-iga üks tund, pesti sooja söötmega, rakkude plasmamembraan värviti CellMask Green värviga, fikseeriti 4% PFA-ga ja rakutuomad värviti DAPIga. Andmed on saadud konfokaalmikroskoobiga tehtud piltide kvantifitseerimisel ja analüüsimisel. Veapiirid tähistavad standardviga ($n = 6$).

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Allan Tobi _____

(autori nimi)

(sünnikuupäev: _____ 14.08.1991 _____)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

_____, „CendR-peptiidiga suunatud terapeutiliste hõbeda nanoosakeste mõju
eesnäärmele rakkele“ _____,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on Anne-Mari Anton Willmore, Tambet Teesalu ja Margus Pooga,

(juhendaja nimi)

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete
kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016 (*kuupäev*)